

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Aufbau eines Systems zur Untersuchung peroxisomaler
Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle
mittels Biolumineszenz Resonanzenergietransfer**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrich Andreas Schatz
aus Hermannstadt (Sibiu), Rumänien

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas

Prof. Dr. Axel Imhof

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Søren W. Gersting

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2014

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abkürzungen..... | VIII |
| Zusammenfassung | X |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Bedeutung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI)..... | 1 |
| 1.2. Methoden zur Detektion von PPI | 2 |
| 1.2.1. Förster-Resonanzenergietransfer-Verfahren zur Detektion von PPI..... | 2 |
| 1.2.1.1. Förster-Resonanzenergietransfer..... | 2 |
| 1.2.1.2. Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET) | 5 |
| 1.2.1.3. Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET) | 5 |
| 1.2.1.4. Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) | 6 |
| 1.2.2. Andere Verfahren zur Detektion von PPI | 7 |
| 1.2.2.1. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)..... | 7 |
| 1.2.2.2. Co-Immunpräzipitation..... | 7 |
| 1.2.2.3. Yeast two-hybrid (Y2H)-System | 8 |
| 1.2.2.4. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie | 8 |
| 1.2.2.5. Tandem Affinitätsreinigung (TAP)..... | 8 |
| 1.2.2.6. Massenspektrometrische Hochdurchsatz Proteinkomplex-Identifikation (HMS-PCI) | 10 |
| 1.2.2.7. Synexpression (korrelierte mRNA-Expression) und genetische Interaktionen | 10 |
| 1.2.2.8. In silico-Vorhersagen durch Genomanalysen | 10 |
| 1.3. Anforderungen an die Methoden zur Detektion von PPI..... | 10 |
| 1.4. Das Peroxisom..... | 13 |
| 1.4.1. Funktionen des Peroxisoms | 13 |
| 1.4.2. Biogenese und Vermehrung der Peroxisomen | 14 |
| 1.4.3. Biosynthese peroxisomaler Membranen und Import von Membranproteinen | 15 |
| 1.4.4. Import peroxisomaler Matrixproteine | 15 |
| 1.4.5. Die Peroxine PEX3 und PEX19 | 17 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|----|
| 1.4.6. | Das Peroxin PEX26..... | 17 |
| 1.4.7. | Der peroxisomale ABC-Transporter ABCD1 | 18 |
| 1.4.8. | Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen | 19 |
| 1.5. | Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 2. | Material und Methoden | 22 |
| 2.1. | Materialien und Geräte | 22 |
| 2.1.1. | Chemikalien..... | 22 |
| 2.1.2. | Allgemeine Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.1.3. | Bakterienstämme | 22 |
| 2.1.4. | Anzuchtmedien für Prokaryonten | 23 |
| 2.1.5. | Eukaryontische Zell-Linien | 23 |
| 2.1.6. | Medien und Antibiotika für die eukaryontische Zellkultur | 23 |
| 2.1.7. | Enzyme zur DNA-Modifikation | 24 |
| 2.1.8. | Eingesetzte Materialien für die DNA-Sequenzierung | 24 |
| 2.1.9. | Längen- und Molekulargewichtsstandards | 24 |
| 2.1.10. | Reagenzien für die horizontale gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren | 24 |
| 2.1.11. | Primäre und sekundäre Antikörper sowie Nachweisreagenzien für die Immunfluoreszenz | 24 |
| 2.1.12. | Geräte, Reagenzien und Material zur Transfektion..... | 25 |
| 2.1.13. | Vektoren und Plasmide | 25 |
| 2.1.14. | Substrate für Lumineszenz- und BRET-Messungen | 25 |
| 2.1.15. | Gerät zur High Throughput-Detektion | 25 |
| 2.1.16. | Gerät zur Detektion des Energietransfers am Spektrophotometer (BRET-Scan) | 26 |
| 2.1.17. | Fluoreszenzmikroskop und Fluoreszenzfilter | 26 |
| 2.2. | Methoden | 27 |
| 2.2.1. | Molekularbiologische Methoden..... | 27 |
| 2.2.1.1. | Anzucht von Escherichia coli | 27 |
| 2.2.1.2. | Escherichia coli Dauerkulturen | 27 |
| 2.2.1.3. | Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen..... | 27 |
| 2.2.1.4. | Isolierung von Plasmiden aus E. coli-Zellen | 28 |
| 2.2.1.4.1. | Miniprep von Plasmid-DNA | 28 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| 2.2.1.4.2. Midi- bzw. Maxiprep von Plasmid-DNA..... | 28 |
| 2.2.1.5. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 29 |
| 2.2.1.6. Horizontale Gelelektrophorese im Agarosegel | 29 |
| 2.2.1.7. Aufreinigung und Gelelution von DNA | 29 |
| 2.2.1.8. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 29 |
| 2.2.1.9. Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Enden | 30 |
| 2.2.1.10. Ligation | 30 |
| 2.2.1.11. PCR-Amplifikation..... | 30 |
| 2.2.1.11.1. Expand High Fidelity PCR System..... | 30 |
| 2.2.1.11.2. Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase | 31 |
| 2.2.1.12. DNA-Sequenzanalyse | 31 |
| 2.2.1.13. Site Directed Mutagenesis..... | 32 |
| 2.2.1.14. Gateway [®] Cloning..... | 33 |
| 2.2.1.14.1. Erstellung von <i>entry clones</i> (BP-Reaktion) | 34 |
| 2.2.1.14.2. Erstellung von <i>expression clones</i> (LR-Reaktion) | 34 |
| 2.2.1.15. Klonierung mittels In-Fusion [®] PCR Cloning System..... | 34 |
| 2.2.2. Zellbiologische Methoden..... | 35 |
| 2.2.2.1. Allgemeine Zellkultur | 35 |
| 2.2.2.2. Generationswechsel der Zellen | 35 |
| 2.2.2.3. Vorbereitung der Zellen für die Nukleofektion | 35 |
| 2.2.2.4. Hochdurchsatz-Transfektion am Amaxa TM Nucleofector TM 96-well Shuttle TM System... | 36 |
| 2.2.2.5. Transfektion am Amaxa Nucleofector [®] II..... | 37 |
| 2.2.3. Fluoreszenzspektroskopische Methoden | 37 |
| 2.2.3.1. Hochdurchsatz-Detektion des in vivo-BRET am LUMIstar OPTIMA | 37 |
| 2.2.3.2. Detektion des in vivo-BRET am Cary Eclipse Spektrophotometer (BRET-Scan)..... | 37 |
| 2.2.3.3. BRET-Ratio..... | 38 |
| 2.2.3.4. Immunfluoreszenzfärbung | 38 |
| 2.2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie | 39 |
| 3. Ergebnisse..... | 40 |
| 3.1. Etablierung einer neuen Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen..... | 40 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|----|
| 3.1.1. | Erstellung der <i>destination vectors</i> (DEST-Vektoren) für das Gateway®-System | 40 |
| 3.1.1.1. | Verwendung von Rluc mit humanisiertem Codongebrauch (hRluc) | 40 |
| 3.1.1.1.1. | Erstellung von N-hRluc-DEST | 41 |
| 3.1.1.1.2. | Erstellung von C-hRluc-DEST | 42 |
| 3.1.1.2. | Mutagenisierung von EYFP zu Venus | 43 |
| 3.1.1.2.1. | Erstellung von N-Venus-DEST | 45 |
| 3.1.1.2.2. | Erstellung von C-Venus-DEST | 46 |
| 3.1.2. | <i>Rapid cloning</i> : Erstellung von Gateway®-Konstrukten | 46 |
| 3.1.2.1. | Erstellung att-site-flankierter PCR-Produkte | 48 |
| 3.1.2.2. | Erstellung von entry clones (BP-Reaktion) | 51 |
| 3.1.2.3. | Erstellung von expression clones (LR-Reaktion) | 51 |
| 3.1.3. | Transiente Hochdurchsatz-Transfektion in eukaryonte Zellen mittels Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System (Nukleofektion)..... | 51 |
| 3.1.3.1. | Optimierung der Programmwahl..... | 52 |
| 3.1.3.2. | Optimierung der Zellzahl..... | 52 |
| 3.1.3.3. | Optimierung der DNA-Konzentration | 53 |
| 3.1.4. | Hochdurchsatz-Detektion am LUMIstar OPTIMA (BMG Labtech) | 55 |
| 3.1.4.1. | Optimierung des Injektionsmodus (Time Optimized Modus) | 56 |
| 3.1.4.2. | Verkürzung der Messzeit | 57 |
| 3.1.5. | Detektion des Energietransfers am Spektrophotometer (BRET-Scan) | 58 |
| 3.1.6. | Bestimmung eines Schwellenwertes für positive Interaktionen..... | 59 |
| 3.1.7. | <i>Orientation matters</i> – die Bedeutung der Struktur der Fusionsproteine für die Interaktion | 60 |
| 3.1.7.1. | Vier Experimente bei Untersuchung der Homodimerisierung..... | 61 |
| 3.1.7.2. | Acht Experimente bei Untersuchung der Heterodimerisierung..... | 61 |
| 3.1.8. | Modifikation der Akzeptor/Donor-Ratio zur Unterscheidung richtig-positiver von falsch- positiven Ergebnissen | 62 |
| 3.1.8.1. | Untersuchung einer positiven Interaktion: Homodimerisierung von ADRB2 | 63 |
| 3.1.8.2. | Untersuchung einer negativen Interaktion: Homodimerisierung von CD2..... | 64 |
| 3.2. | Validierung bekannter Interaktionen in verschiedenen zellulären Kompartimenten | 66 |
| 3.2.1. | Zellmembran: ADRB2 | 66 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 3.2.2. Zytoplasma und Peroxisom: PEX19 und PEX3 | 66 |
| 3.2.3. Peroxisom: ABCD1 | 67 |
| 3.3. Homodimerisierung von PEX26 | 69 |
| 3.3.1. Charakterisierung der neu identifizierten PPI: Homodimerisierung von PEX26..... | 69 |
| 3.3.2. Intrazelluläre Lokalisation der Venus-Fusionsproteine von PEX26..... | 70 |
| 3.3.3. Eingrenzung der Interaktionsdomäne an verkürzten PEX26-Konstrukten | 70 |
| 3.3.4. Untersuchung der Splice-Variante PEX26 delta-Exon5 | 72 |
| 3.3.4.1. Klonierung von pENTR PEX26 Δ ex5 mittels In-Fusion® PCR Cloning System (Clontech)..... | 72 |
| 3.3.4.2. Interaktionen der PEX26 Δ ex5 Splice-Variante | 73 |
| 4. Diskussion | 76 |
| 4.1. Aufbau des BRET-basierten <i>in vivo</i> -Hochdurchsatz Verfahrens | 76 |
| 4.2. Evaluierung der Methode durch Bestätigung positiver und negativer PPI | 78 |
| 4.3. Homodimerisierung von PEX26 | 80 |
| 4.4. Dimerisierung von PEX26 Δ ex5..... | 80 |
| 4.5. Bedeutung der PEX26-Homodimerisierung | 81 |
| 4.6. Ausblick zur Bedeutung der PEX26-Dimerisierung | 85 |
| Abbildungsverzeichnis | 87 |
| Tabellenverzeichnis | 89 |
| Literaturverzeichnis..... | 90 |
| Danksagung..... | 99 |

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen

| | |
|--------------------------|---|
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| att-site | <i>Attachment site</i> |
| AS | Aminosäure(n) |
| BiFC | Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation |
| bp | Basenpaare |
| BRET | Biolumineszenz Resonanzenergietransfer |
| Co-IP | Co-Immunpräzipitation |
| ddNTPs | Didesoxynukleotide |
| DEST | <i>Destination</i> |
| Δ ex5 | Delta Exon 5 |
| DONR | Donor |
| dsDNA | Doppelstrang-DNA |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECFP | <i>Enhanced cyan fluorescent protein</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EYFP | <i>Enhanced yellow fluorescent protein</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| fl | <i>Full length</i> |
| FLIM | Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (<i>fluorescence lifetime imaging</i>) |
| FRET | Fluoreszenz Resonanzenergietransfer |
| FWHM | <i>Full width at half maximum</i> |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| Gly | Glycin |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| H ₂ O bidest. | Bidestilliertes Wasser |
| hRluc | Humanisierte Renilla Luziferase |
| iBRET | <i>improved BRET</i> |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------|--|
| IRD | Infantile Refsum-Erkrankung (<i>infantile Refsum's disease</i>) |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| kDa | Kilo-Dalton |
| LDA | Lineare Diskriminanzanalyse |
| mPTS | Peroxisomales Membranprotein Targeting-Signal |
| NALD | Neonatale Adrenoleukodystrophie |
| PAH | Phenylalanin-Hydroxylase |
| PBD | Peroxisomaler Biogenese-Defekt |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PMP | Peroxisomales Membranprotein (<i>peroxisomal membrane protein</i>) |
| PPI | Protein-Protein-Interaktion |
| PTS | <i>Peroxisomal targeting signal</i> |
| RCDP | Rhizomele Chondrodysplasia punctata |
| RET | Resonanzenergietransfer |
| RLU | <i>Relative light units</i> |
| Rluc | Renilla Luziferase |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| RT | Raumtemperatur |
| SAP | <i>Shrimp alkaline phosphatase</i> |
| Ser | Serin |
| SHH | <i>Sonic hedgehog signalling pathway</i> |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>) |
| TAP | Tandem Affinitätsreinigung (<i>tandem affinity purification</i>) |
| TEV | <i>tobacco etch virus</i> |
| TMD | Transmembrandomäne |
| VLCFA | <i>Very long chain fatty acids</i> |
| XALD | X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie |
| Y2H | <i>Yeast two-hybrid</i> |
| YFP | <i>Yellow fluorescent protein</i> |
| ZS | Zellweger-Syndrom |

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung

Proteine werden durch Gene kodiert und sind die Vermittler biologischer Strukturen und Prozesse. Veränderungen der Gene haben einen Einfluss auf die Struktur und Funktion der Proteine. Zur Erfüllung ihrer Aufgaben bilden Proteine über Protein-Protein-Interaktionen (PPI) Komplexe oder Funktionseinheiten. Diese zu kennen, ist wesentlich für das Verständnis der Funktion einzelner Proteine im Gesamtkontext und um den Einfluss von genetischer Variation auf die Proteinfunktion im Rahmen angeborener Erkrankungen besser einordnen zu können.

Bislang werden PPI einerseits v.a. mit Hochdurchsatz-Verfahren untersucht, bei welchen die Proteine nicht in ihrer biologischen Umgebung exprimiert oder in denaturierter Form verwendet werden; dadurch ist häufig mit Artefakten zu rechnen. Andererseits erfordern die Verfahren zur *in vivo*-Untersuchung biologisch relevanter Interaktionen einen hohen Aufwand.

Wir beschreiben in dieser Arbeit den Aufbau und die Etablierung eines Verfahrens zur *in vivo* Hochdurchsatz-Untersuchung von PPI. Dieses beruht auf der Technologie des Biolumineszenz Resonanzenergietransfers (BRET), welche durch Optimierung des Prozesses zu *improved* BRET (iBRET) hinsichtlich Effizienz, Durchsatz und Validität verbessert wurde. Dabei wurde die Konstrukt-Klonierung durch Einsatz eines auf Rekombination basierenden Klonierungssystems beschleunigt und Effizienz sowie Durchsatz der Transfektion von eukaryonten Zellen mit Hilfe eines Elektroporationsverfahrens im 96-Well Format optimiert. Bei der Detektion wurde ein Substrat verwendet, welches nur von lebenden Zellen verarbeitet werden kann. Die Signalmessungen erfolgten automatisiert an einem Multiwell Plattenlesegerät. Die Auswertung wurde durch eine bioinformatische Methode zur Berechnung von Schwellenwerten für positive Interaktionen verbessert.

Mit dieser Technologie konnte die Homodimerisierung von PEX26 erstmals beschrieben und charakterisiert werden. PEX26 ist ein Membranprotein des Peroxisoms, das am Import von Matrixproteinen in das Peroxisom beteiligt ist. Bei genetischen PEX26-Defekten kommt es zum Auftreten von sog. *peroxisomal ghosts* – dies sind Membrankompartimente ohne Matrixinhalt. Klinisch kommt es v.a. zu Erkrankungen aus dem Zellweger-Spektrum, die sich mit einem unterschiedlichen Schweregrad manifestieren.

Anhand von Trunkierungs-Konstrukten identifizierten wir mittels iBRET die zwei Interaktionsdomänen für die Homodimerisierung am C-Terminus des Proteins in der Umgebung der Transmembrandomäne bzw. in der peroxisomalen Matrix. Diese liegen abseits der für den Matrixprotein-Import essentiellen Bindedomäne für PEX6, der sich im zum Zytosol gerichteten N-terminalen Abschnitt von PEX26 befindet.

Neben dem Volllängeprotein PEX26 wurde auch die Splice-Variante PEX26 Δ ex5 beschrieben, welcher das Exon 5 und damit die Transmembrandomäne fehlt. Diese Variante ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytoplasma lokalisiert. Wir zeigten, dass auch sie

ZUSAMMENFASSUNG

Homodimere bildet und zudem das Volllängeprotein PEX26 bindet. Sie ist in der Lage, das Fehlen von funktionellem PEX26 in PEX26-Defektzelllinien zu etwa 50% zu komplementieren, obwohl das Protein nicht am Peroxisom lokalisiert ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich PEX26 für den Matrixprotein-Import nicht zwingend am Peroxisom befinden muss. Die physiologische Funktion der Splice-Variante ist noch nicht aufgeklärt.

Mittlerweile ist bekannt, dass auch PEX26 anteilig im ER lokalisiert ist und es mehren sich die Hinweise, dass es aufgrund der Herkunft der Peroxisomen aus dem ER bei deren Biogenese und Homöostase eine Rolle spielt. Wir führten eine Literaturrecherche nach Interaktionspartnern von PEX26 und seinem homologen Protein Pex15p aus der Hefe durch, fanden hier jedoch keinen Hinweis auf weitere Funktionsbereiche von PEX26. Klar ist jedoch, dass sich die unterschiedliche Manifestation der Defekte bei den Patienten nicht allein aus seiner Rolle beim Import von Matrixproteinen ableiten lässt. Basierend auf der vorliegenden Arbeit könnten Erkenntnisse aus der derzeit in unserer Arbeitsgruppe umgesetzten Untersuchung des peroxisomalen Interaktoms zu einem besseren Verständnis der Funktion von PEX26 und der Fehlfunktion bei PEX26-Defekt beitragen.

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI)

Nach erfolgreicher Entschlüsselung des Genoms von *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.* 2000) folgten in den vergangenen Jahren weitere Organismen, wie das Parainfluenza-Virus (Lee und Lee 2013). Auch das humane Genom wurde entschlüsselt (Wang, J. *et al.* 2008; Ahn *et al.* 2009) und das *whole exome* bzw. *genome sequencing* werden zunehmend bei der Suche nach pathogenen Mutationen in unklaren Erkrankungsfällen (Ng *et al.* 2010; Worthey *et al.* 2011), zur klinischen Risikoabschätzung (Ashley *et al.* 2010) oder in der Tumorforschung angewendet (Ley *et al.* 2008).

Aufgrund dieser Erfolge auf dem Gebiet der funktionellen Genomik ist die funktionelle Charakterisierung der beschriebenen Gene auf der Ebene der Proteine zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Dabei spielt in der Proteom-Forschung die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) eine herausragende Rolle, da auf diese Weise Rückschlüsse auf den biologischen Kontext und die Funktion der einzelnen Gene bzw. Proteine gezogen werden können.

Neben der Analyse einzelner Interaktionen werden zunehmend Interaktionsnetzwerke ganzer Organismen, beispielsweise für *Herpes simplex* (Uetz *et al.* 2006) und *Drosophila melanogaster* (Guruharsha *et al.* 2012) oder von Organisationsstrukturen innerhalb eines Organismus, z.B. von Organellen, beschrieben (Stuart *et al.* 2007). Dabei ermöglicht die Kartierung und Analyse dieser Interaktome einen Einblick in die komplexen regulatorischen Netzwerke der Zellfunktion. So wird das Verständnis für grundlegende physiologische Prozesse gemehrt und es können Erkenntnisse zur Pathogenese von Erkrankungen gewonnen werden.

Derzeit sind in OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*[®]; <http://www.omim.org>) knapp 22.000 Gene beschrieben, von denen über 3.000 mit Phänotyp-verursachenden Mutationen vergesellschaftet sind. Auf Proteinebene sind beim Menschen aktuell über 43.000 physikalische PPI beschrieben (Pesch und Zimmer 2013), es wird jedoch von ca. 650.000 zu erwartenden PPI ausgegangen (Abbildung 1) (Stumpf *et al.* 2008). Mithilfe von PPI können Hinweise auf neue krankheitsverursachende Gene erhalten werden und durch die Darstellung ihrer Interaktionsnetzwerke können erkrankungsspezifische Sub-Netzwerke innerhalb der Zelle beschreiben werden (Ideker und Sharan 2008). Dabei führen Proteine, die miteinander interagieren oder in einem Interaktionsnetzwerk nahe beieinander liegen, zu Erkrankungen mit ähnlichem Phänotyp (Jonsson und Bates 2006). Proteine, deren Gendefekte zu Erkrankungen führen, sind – mit Ausnahme von an der Karzinogenese beteiligten Proteinen – in Interaktionsnetzwerken i.d.R. nicht in zentraler Position, sondern am Rand lokalisiert (Goh *et al.* 2007). Dies weist darauf hin, dass im Zentrum von PPI-Netzwerken gelegene Proteine, sog. *hubs*, essentiell bzw. unverzichtbar für die Zellfunktion sind. Um ein genaueres Abbild von pathogenen

EINLEITUNG

Prozessen zu erhalten, wurden auch Gewebe-spezifische Interaktionsnetzwerke erstellt (Magger *et al.* 2012).

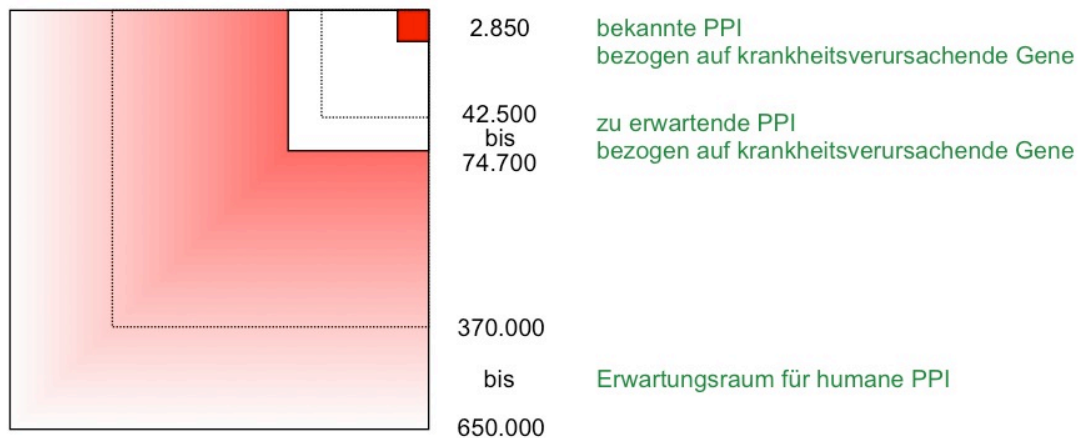


Abbildung 1: Anzahl bekannter und zu erwartenden PPI beim Menschen

Die Anzahl bekannter PPI krankheitsverursachender Gene beträgt derzeit ca. 5% der geschätzten Zahl. Insgesamt werden bis zu 650.000 Interaktionen humaner Proteine erwartet. PPI = Protein-Protein-Interaktionen. (Abbildung erstellt nach Vorlage von S.W. Gersting)

1.2. Methoden zur Detektion von PPI

Interaktome werden mit verschiedenen biochemischen, biophysikalischen und genetischen Methoden im Hochdurchsatz untersucht (von Mering *et al.* 2002). Dazu gehören Verfahren wie das *yeast two-hybrid* (Y2H)-System und die Co-Immunpräzipitation (Co-IP), aber auch neue Techniken wie die Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*; SPR)-Spektroskopie oder die Tandem Affinitätsreinigung (*tandem affinity purification*; TAP). Eine weitere Gruppe stellen die auf Resonanzenergietransfer nach Förster basierenden optischen Verfahren dar, deren klassischer Vertreter, der Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET) weite Verbreitung gefunden hat. In den vergangenen Jahren wurde FRET häufig durch eine Methode ersetzt, die ebenfalls auf diesem Prinzip beruht, den Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET) (siehe 1.2.1.3).

1.2.1. Förster-Resonanzenergietransfer-Verfahren zur Detektion von PPI

1.2.1.1. Förster-Resonanzenergietransfer

Das Modell für den Resonanzenergietransfer (RET) wurde 1946 von Theodor Förster entwickelt (Förster 1946) und von Stryer und Haugland experimentell bestätigt (Stryer und Haugland 1967). Das Modell sieht vor, dass ein angeregter Energie-Donor seine Energie an einen benachbarten Akzeptor abgibt. Das Überlappen des Donor-Emissionsspektrums mit dem Absorptions- bzw. Exzitationsspektrum des Akzeptors stellt die entscheidende Voraussetzung für diesen Energietransfer dar (Abbildung 2).

EINLEITUNG

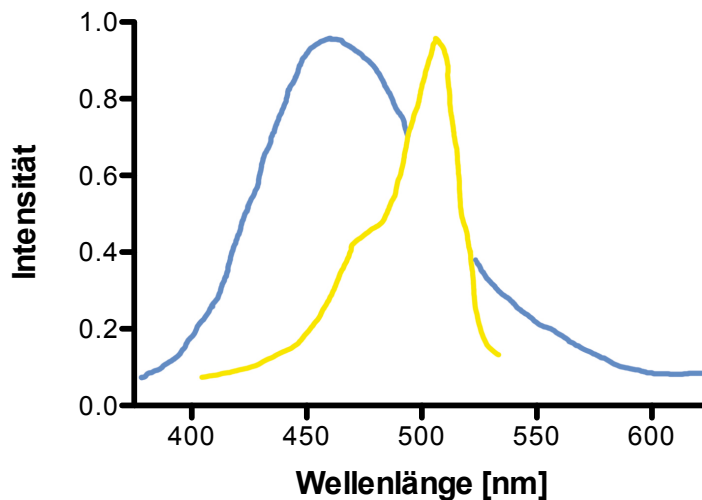


Abbildung 2: Spektrale Überlappung von Donor und Akzeptor

Dargestellt sind das Emissionsspektrum der Renilla Luziferase (blau) und das Exzitationsspektrum des *yellow fluorescent protein* (gelb). Es besteht eine deutliche Überlappung der beiden Spektren (Pfleger und Eidne 2006).

Auf die Effizienz des Energietransfers haben vor allem die Entfernung der beiden Partner, die bei diesen Fluorophoren nicht größer als 10 nm (100 Å) sein darf, sowie deren relative Orientierung im Raum einen Einfluss. Der Förster-Radius (R_0) bezeichnet dabei den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Effizienz (E) der strahlungsfreien Energieübertragung via RET zwischen diesen beiden Molekülen 50% beträgt. Folglich werden bei dieser Entfernung die anderen 50% der Energie vom Donor als Fluoreszenz emittiert oder durch andere Prozesse abgegeben (Abbildung 3). Der tatsächliche Abstand zwischen beiden Fluorophoren, der Radius (r), fließt mit der umgekehrten sechsten Potenz in die Effizienz des RET ein:

$$E = 1 / [1 + (r / R_0)^6]$$

Für das in dieser Arbeit verwendete BRET-Paar Renilla Luziferase (Rluc) und *yellow fluorescent protein* (YFP) wurde ein Förster-Radius von 4,4 nm berechnet (Dacres *et al.* 2010).

EINLEITUNG

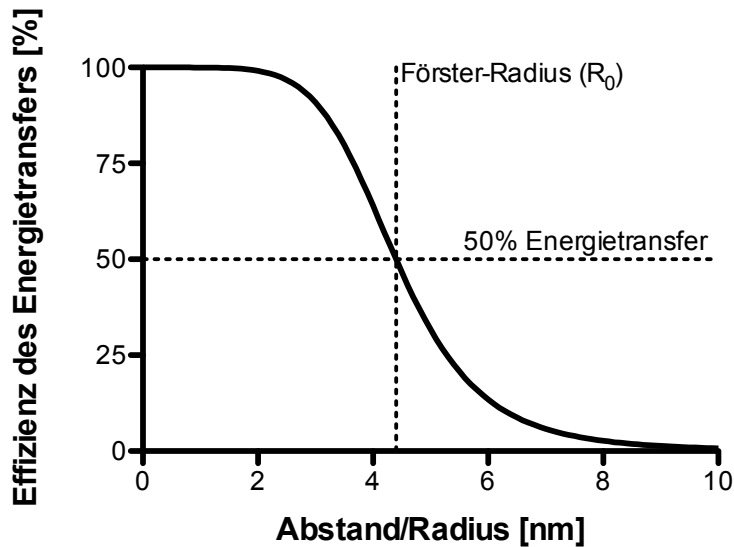


Abbildung 3: Donor-Akzeptor-Abstand und Effizienz des Energietransfers

Bei Erreichen des Förster-Radius (4,4 nm bzw. 44 Å) werden 50% der Energie des Donors auf den Akzeptor übertragen. Bei 10 nm Abstand stehen lediglich 0,7% der Energie für den Transfer zur Verfügung.

Die Energieübertragung erfolgt beim RET jedoch strahlungsfrei über quantenmechanische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ohne Emission bzw. Absorption von Photonen oder die Produktion von Wärme. Die zugrundeliegende Hypothese beruht auf dem von Jablonski im Jahr 1935 entwickelten Modell, nach dem Elektronen bei Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen durch Absorption der Energie aus ihrem Grundzustand (S_0) in energetisch höherliegende Orbitale angeregt werden (S_1) (Jablonski 1935). Die Relaxation in den Grundzustand kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Dies ist durch das Jablonski-Diagramm in Abbildung 4 veranschaulicht.

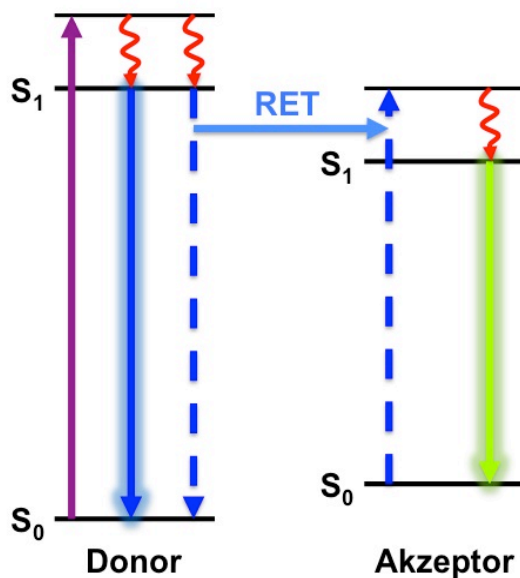


Abbildung 4: Resonanzenergietransfer nach Jablonski

Das Jablonski-Diagramm zeigt ein Donor-Akzeptor-Paar. Die Elektronen des Donors werden durch Energie aus Photonen oder durch eine enzymatische Reaktion aus dem Grundzustand (S_0) in den angeregten Zustand (S_1) versetzt (violetter Pfeil). Da der Zustand S_1 nicht homogen (es bestehen energetische Zustände

EINLEITUNG

oberhalb des S_1 -Grundniveaus) und instabil ist, wird intramolekular der Zustand S_0 angestrebt. Dabei wird die aufgenommene Energie auf unterschiedliche Weise wieder freigesetzt: dies kann als Fluoreszenz bzw. Lumineszenz (dunkelblauer durchgehender Pfeil) oder in Anwesenheit eines Energieakzeptors strahlungsfrei als RET (hellblauer Pfeil) erfolgen. Die durch den RET transferierte Energie ermöglicht den Elektronen des Donors die Rückkehr von S_1 nach S_0 bzw. im Akzeptor den Wechsel von S_0 nach S_1 (gestrichelte dunkelblaue Pfeile). Im Anschluss wird die durch den Akzeptor absorbierte Energie als Photonen abgegeben (grüner Pfeil).

1.2.1.2. Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET) beruht auf dem strahlungsfreien RET zwischen zwei Fluoreszenzproteinen. Gewöhnlich werden dafür Varianten des *green fluorescent protein* (GFP) verwendet. Bei GFP handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt. Bei Anregung durch Aequorin, eine Luziferase aus dieser Qualle, emittiert GFP Licht im grünen Spektralbereich (Shimomura *et al.* 1962). Da GFP weder Substrat noch Co-Faktor für die Fluoreszenz benötigt, kann es *in vivo* und *in vitro* verwendet werden.

Für den experimentellen Einsatz als Fluoreszenzprotein wurde GFP, ein 238 Aminosäuren (AS) großes Protein, durch Mutagenisierung der Primärstruktur verändert. Dabei wurde neben der Stabilität bzw. Temperaturrestistenz des Proteins auch sein Fluoreszenzspektrum modifiziert. Auf diese Weise entstanden neben YFP auch die Fluorophore EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*), die sich als Paarung für FRET-Analysen eignen. Dies beruht auf der Überlappung des Emissionsspektrums von ECFP mit dem Absorptionsspektrum von EYFP im blauen Spektralbereich.

Damit dieser Energietransfer stattfinden kann, müssen sich die beiden Reporterproteine in einem Abstand von maximal 100 Å (Förster-Radius, siehe 1.2.1.1) befinden. Dieser Abstand ist häufig dann gegeben, wenn die beiden Fluorophore jeweils gentechnisch an einen Partner eines Interaktionspaares gekoppelt werden. Im Falle einer PPI führt die Anregung von ECFP zu einem Energietransfer auf EYFP. Dieser kann mikroskopisch oder spektroskopisch sichtbar gemacht bzw. quantifiziert werden.

1.2.1.3. Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET)

Der Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET) tritt in der Natur bei mehreren Organismen auf, beispielsweise bei *Renilla reniformis*. Dieses Korallentierchen exprimiert die Renilla Luziferase (Rluc), welche bei Oxidation des Substrates Coelenterazin *in vitro* blaues Licht emittiert. *In vivo* erfolgt ein Transfer dieser Energie auf das nicht-kovalent gebundene *Renilla green fluorescent protein*, was zu einer Emission von grünem Licht führt. Das System besteht somit aus einem Energie-Donor und einem Energie-Akzeptor.

Mit BRET können in *real time* konstitutive und induzierte PPI, Änderungen der Konformation von Proteinen sowie Abstände zwischen Proteinen in lebenden Zellen nachgewiesen bzw. gemessen werden (Stryer und Haugland 1967; Boute *et al.* 2001). Die Methode basiert auf der Verwendung von Fusionsproteinen, bestehend aus einem Protein A und Rluc sowie einem potentiellen

EINLEITUNG

Interaktionspartner von Protein A, Protein B, gekoppelt an YFP, die gelbe Variante von GFP (siehe 1.2.1.2). Durch Zugabe des membranpermeablen lipophilen Substrates der Luziferase, Coelenterazin, wird die Reaktion gestartet. Findet keine Interaktion der beiden Proteine A und B statt, so erfolgt kein RET und die Luziferase emittiert die bei dem enzymatischen Prozess freiwerdende Energie in Form von Licht mit einem Emissionsmaximum bei 480 nm. Interagieren jedoch die beiden Proteine miteinander, so werden auch die beiden BRET-Partner zusammengeführt und ein Energietransfer ermöglicht. Dieser wird durch ein zweites Emissionsmaximum bei 527 nm sichtbar, das die YFP-Emission infolge des Energietransfers darstellt (Abbildung 5). Auch beim BRET sind Abstand der beiden Reporterproteine Rluc und YFP und ihre Orientierung im Raum entscheidend für die Effizienz des Energietransfers.

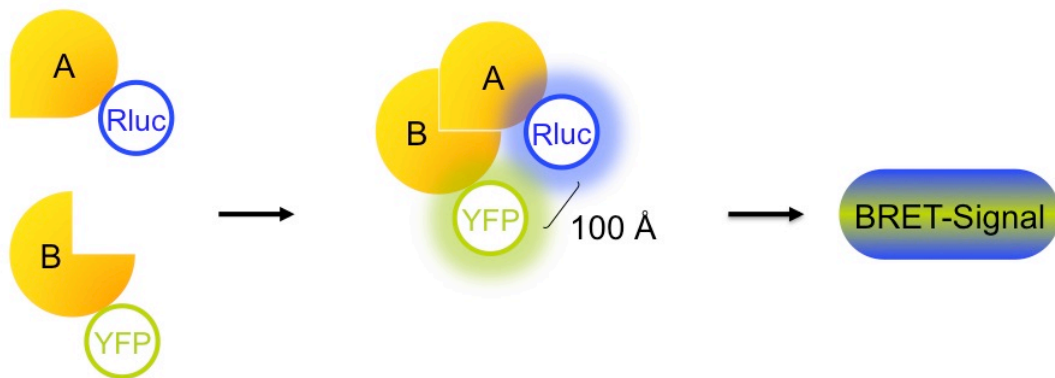


Abbildung 5: Schematische Darstellung des BRET

Rluc wird an Protein A gekoppelt und YFP an Protein B. Im Falle einer positiven Interaktion der Proteine A und B gelangen Rluc und YFP innerhalb des für einen RET erforderlichen Abstand von unter 100 Å. Infolgedessen kommt es zu einem Energietransfer und einem positiven BRET-Signal.

Das zuvor beschriebene BRET-Verfahren wird als BRET¹ bezeichnet. Daneben existiert eine weitere Variante dieser Methode, BRET². Diese beruht auf Rluc und GFP als Reporter, wobei als Substrat für die Luziferase Bidesoxy-Coelenterazin (DeepBlueCTM) verwendet wird. Die Verwendung dieses Substrates führt zu einem anderen Emissionsspektrum von Rluc, mit dem Vorteil, dass die Emission von Donor und Akzeptor wesentlich weiter auseinander liegen und die Signale damit bei der Messung besser getrennt werden können. Jedoch ist die Quantenausbeute bei BRET² wesentlich geringer als bei BRET¹, was die Sensitivität der Methode einschränkt (Ayoub und Pfleger 2010).

1.2.1.4. Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM)

Die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) beruht auf der unterschiedlichen Lebensdauer fluoreszierender Moleküle im angeregten Zustand. Sie wurde im Jahr 1959 zum ersten Mal beschrieben (Venetta 1959). Die Fluoreszenzlebensdauer ist die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand S_1 verbleibt, bevor es unter Abgabe von Energie bzw. Photonen in den Grundzustand S_0 zurückkehrt (Abbildung 4). Dies kann anhand der exponentiellen Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops abgebildet werden. Dabei ist die Fluoreszenzlebensdauer für einen Farbstoff spezifisch, kann

EINLEITUNG

jedoch durch seine chemische Umgebung oder einen Energietransfer beeinflusst werden (Sun *et al.* 2012).

Es wurden zwei Verfahren entwickelt, die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen, zum einen die gepulste Anregung und zum anderen die Phasenmodulierung (Sun *et al.* 2012). Bei der gepulsten Anregung wird das Fluorophor pulsatil durch wenige Picosekunden dauernde Lichtimpulse angeregt und die emittierten Photonen gemessen, die aufgrund der begrenzten Fluoreszenzlebensdauer über die Zeit abnehmen. Bei der Phasenmodulierung wird die Intensität des Anregungslichts sinusförmig moduliert und das Fluoreszenzsignal gemessen. Aus der Phasenverschiebung des Fluoreszenzsignals kann die Fluoreszenzlebensdauer abgeleitet werden.

Da FRET die Fluoreszenzlebensdauer des Donors reduziert, können PPI durch deren Vergleich in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Akzeptors untersucht werden. Um vergleichbare experimentelle Bedingungen zu schaffen, hat es sich bewährt, nach der Messung von FLIM in Gegenwart des Akzeptors diesen durch übermäßige Anregung auszubleichen, anschließend erneut zu messen und die Messwerte zu vergleichen (Sun *et al.* 2012).

1.2.2. Andere Verfahren zur Detektion von PPI

1.2.2.1. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Dieses Verfahren wurde im Jahr 2002 zum ersten Mal beschrieben und beruht auf der Komplementation eines geteilten Fluoreszenzproteins durch eine PPI (Hu *et al.* 2002). Zur Untersuchung von PPI werden zumeist GFP-Fragmente verwendet, welche für sich alleine nicht fluoreszieren. Werden diese aber jeweils an ein Interaktionspaar gekoppelt, so kommen sie sich im Idealfall bei einer PPI nahe genug, um ihre Fluoreszenz-Eigenschaften wieder auszubilden. Diese Signale können z.B. an einem Spektrophotometer oder Multiwellreader quantifiziert werden, es kann aber auch ihre Qualität und intrazelluläre Lokalisation mikroskopisch untersucht werden.

1.2.2.2. Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation beruht auf der Bindung und Ausfällung löslicher Antigene bzw. Proteine durch mono- oder polyklonale Antikörper. Dabei werden die Antikörper zu Zelllysaten gegeben, wo sie ihre Antigene binden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden anschließend durch rekombinant hergestelltes Protein G, welches an den Fc-Teil von IgG-Antikörpern bindet, aus den Zelllysaten extrahiert und an eine Trägermatrrix (z.B. Sepharose) fixiert. Dabei enthalten die Antigen-Antikörper-Komplexe auch Bindungspartner der untersuchten Proteine. Nach Trennung der Proteine von den Antikörpern können diese Bindungspartner mittels spezifischer Antikörper oder im Hochdurchsatzverfahren per Massenspektrometrie identifiziert werden (Phizicky und Fields 1995).

EINLEITUNG

1.2.2.3. Yeast two-hybrid (Y2H)-System

Das *yeast two-hybrid* (Y2H)-System beruht auf der Komplementation eines zweiteiligen Transkriptionsfaktors in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Fields und Song 1989). Der Transkriptionsfaktor GAL4 besteht aus einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne. Werden diese beiden Domänen jeweils an interagierende Proteine gekoppelt, so kann bei einer PPI das funktionell vollständig aktive GAL4-Protein entstehen. Sofern dieser Proteinkomplex in der Lage ist, in den Zellkern der Hefen zu translozieren, wird die Transkription regulatorischer Gene aktiviert und das Zellwachstum ausgelöst bzw. gefördert.

Von Vorteil ist dabei, dass das System *in vivo* funktioniert, sehr sensitiv ist und sehr schwache oder kurzzeitige Interaktionen detektieren kann, zudem wurde das Y2H-System zwischenzeitlich für die Verwendung in automatisierten Hochdurchsatzverfahren weiterentwickelt (Baker 2012).

1.2.2.4. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie

Mit der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*; SPR)-Spektroskopie wird die Bildung von Proteinkomplexen anhand der Änderung im Brechungsindex des Lichtes gemessen, das an einer Goldoberfläche reflektiert wird. Dazu wird ein Protein an eine Dextranmembran fixiert. Dies kann durch Beschichtung der Membran mit Avidin und durch Koppelung des Proteins mit Biotin erzielt werden. Nach Bindung des Proteins an die Membran wird diese mit Gold überzogen. Licht wird durch ein Prisma auf die Gold-beschichtete Membran gelenkt und es wird der Winkel der Totalreflexion ermittelt. Eine Proteinlösung mit potentiellen Interaktionspartnern des Proteins fließt nun an der Membran vorbei und bindet das immobilisierte Protein. Dies ändert den Brechungsindex an der Membran und somit den Winkel der Totalreflexion (Phizicky und Fields 1995).

Da alle Proteine den gleichen Brechungsindex haben, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Änderung des Brechungsindex und der Proteinkonzentration. Bei Stattfinden einer PPI ändert sich folglich der Brechungsindex, da mehr Protein an die Membran assoziiert. Die gebundenen Proteine müssen nun von dem an der Membran fixierten Interaktionspartner gelöst und z.B. massenspektrometrisch identifiziert werden.

1.2.2.5. Tandem Affinitätsreinigung (TAP)

Die Tandem Affinitätsreinigung (TAP) nutzt zwei Reinigungsschritte, um Proteinkomplexe aus einem beliebigen Zellsystem zu extrahieren. Das Verfahren wurde im Jahr 1999 zum ersten Mal beschrieben (Rigaut *et al.* 1999). Es beruht auf der Verwendung zweier Affinitätsmoleküle, dem *Staphylococcus aureus* Protein A (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP). Zwischen diesen wird eine Schnittstelle für die *tobacco etch virus* (TEV)-Protease eingeführt (Abbildung 6 A). Dieser Komplex (TAP-tag) wird an das zu untersuchende Protein gekoppelt und gemeinsam

EINLEITUNG

mit diesem in einem Zellsystem exprimiert. Dabei interagiert das Protein mit seinen Bindungspartnern.

Zu deren Untersuchung wird das Protein zunächst durch Bindung von ProtA an eine IgG-Matrix aus dem Zellextrakt isoliert. Nach Entfernen unspezifischer Bindungspartner durch Spülung spaltet die TEV-Protease den Komplex von der ProtA/IgG-Matrix ab. Im zweiten Reinigungsschritt bindet CBP an eine Calmodulin-Matrix und es werden durch Spülung weitere unspezifische Bindungspartner aus dem Ansatz entfernt (Abbildung 6 B). Die Elution der Bindungspartner des Proteins erfolgt durch Zugabe von Chelat-bildenden Substanzen wie EGTA.

Durch die zwei Reinigungsschritte wird bei dieser Methode eine hohe Spezifität erzielt, da unspezifisch an das untersuchte Protein gebundene Proteine zuverlässig entfernt werden (Li 2011). Allerdings eignet sich CBP für den Einsatz in Säugetierzellen nicht, da es hier viele Proteine mit Calmodulin-bindender Eigenschaft gibt, was zu einer hohen Verunreinigung im System führt. Es wurden aber bereits zahlreiche andere TAP-tags entwickelt (Li 2011).

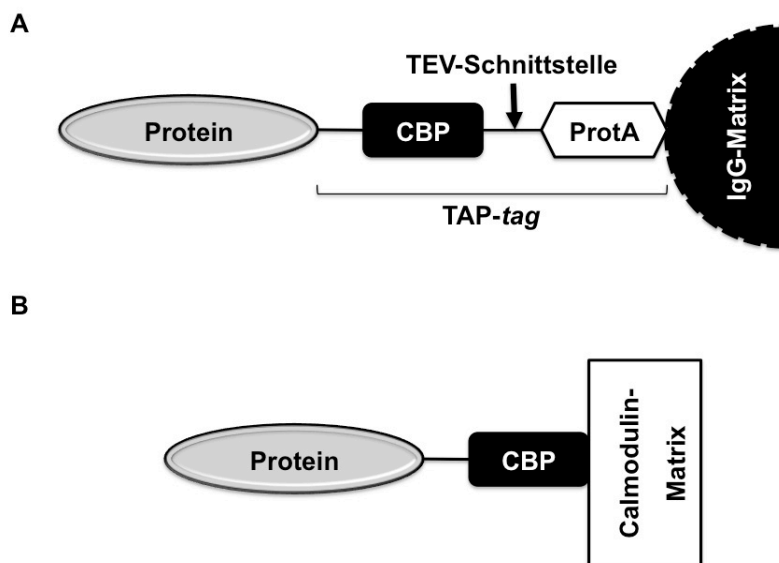


Abbildung 6: Prinzip der Tandem Affinitätsreinigung (TAP)

Das zu untersuchende Protein wird an den TAP-tag gekoppelt (A) und exprimiert. Nach der ersten Reinigung wird an der TEV-Schnittstelle enzymatisch geschnitten und der verbliebene Komplex wird bei der zweiten Reinigung an eine Calmodulin-Matrix gebunden (B). Dort werden erneut unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Schließlich werden die spezifisch an das Protein gebundenen Partner eluiert und am Tandemmassenspektrometer identifiziert. CBP = Calmodulin-bindendes Protein; ProtA = Protein A; TAP = *tandem affinity purification*; TEV = *tobacco etch virus*

EINLEITUNG

1.2.2.6. Massenspektrometrische Hochdurchsatz Proteinkomplex-Identifikation (HMS-PCI)

Bei diesem Verfahren, welches v.a. in der Hefe eingesetzt wird, wird eine definierte Anzahl von Proteinen beispielsweise mit einem Flag-*tag* gekoppelt und exprimiert. Diese Proteine werden in der Folge mitsamt ihrer Bindungspartner durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese isoliert und in einem Tandem-Massenspektrometer identifiziert (Ho *et al.* 2002).

1.2.2.7. Synexpression (korrelierte mRNA-Expression) und genetische Interaktionen

Die Synexpression beruht auf dem Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Gene einer zellulären Funktionseinheit (Cluster). Es wird die Expression definierter Gene eines Clusters im Zellzyklus unter bestimmten Bedingungen überwacht und bei ähnlichem Verhalten zweier oder mehrerer Gene wird davon ausgegangen, dass sie sich gegenseitig beeinflussen – also funktionell interagieren (Ge *et al.* 2001). Eine physikalische PPI liegt dabei jedoch nicht zwingend vor.

Bei genetischen Interaktionen bzw. *synthetic lethality* wird der Einfluss jeweils zweier Gene untersucht, welche für sich allein nicht für das Überleben einer Zelle notwendig sind. Führt eine Mutagenisierung beider Gene zum Absterben der betroffenen Zellen, wird davon ausgegangen, dass die beiden Gene funktionell und möglicherweise auch auf Proteinebene interagieren (von Mering *et al.* 2002).

1.2.2.8. In silico-Vorhersagen durch Genomanalysen

Auf der Grundlage phylogenetischer Untersuchungen und Korrelationen können Hinweise auf mögliche PPI gewonnen werden. Dabei kann hilfreich sein, dass bei Prokaryonten oft ganze Operons konserviert sind, dass in vollständig sequenzierten Genomen beide Interaktionspartner auffindbar sind oder beide fehlen und dass scheinbar nicht verwandte Proteine in einem Polypeptid gefunden werden. Diese Methode bietet eine günstige Möglichkeit zur schnellen genomweiten Analyse und wird mit zunehmender Entschlüsselung weiterer Organismen präziser (von Mering *et al.* 2002; Promponas *et al.* 2012).

1.3. Anforderungen an die Methoden zur Detektion von PPI

Bei der Beurteilung der experimentellen Daten aus PPI-Studien ist es entscheidend, die Stärken und Schwächen der verwendeten Methoden zu kennen und Überlappungen sowie Ergänzungen bei Verwendung mehrerer Verfahren zu berücksichtigen (von Mering *et al.* 2002). So zielen das Y2H-System und massenspektrometrische Methoden auf die Untersuchung physikalischer PPI ab, wohingegen Synexpression, genetische Interaktionen und *in silico*-Vorhersagen funktionelle Zusammenhänge untersuchen, bei welchen PPI nicht im Vordergrund stehen. Proteinkomplex-Untersuchungen von Transmembranproteinen sind häufig schwer zu erfassen, da diese Proteine schwer zu isolieren sind.

EINLEITUNG

Im Y2H-System werden an der Translation beteiligte Proteine häufig nicht erfasst. Zudem kann der Transport der Proteine in den Zellkern Probleme bereiten, insbesondere wenn es sich um Membranproteine oder Organell-spezifische Proteine handelt. Aufgrund der hohen Sensitivität des Systems kommt es jedoch oft zu falsch-positiven PPI, u.a. weil positive Interaktionen häufig nicht im biologischen Kontext stattfinden (von Mering *et al.* 2002). Bei der SPR-Spektroskopie kann die Immobilisation des Proteins an die Membran dessen Bindungseigenschaften verändern und es kann sogar zur Denaturierung des Proteins kommen (Phizicky und Fields 1995).

Aufgrund der Größe der GFP-Varianten kann es bei FRET bzw. BRET zur sterischen Behinderung einer PPI kommen (Soukupova *et al.* 1999). Dies kann auch bei jeder anderen Methode auftreten, bei welcher *tags* verwendet werden, wie TAP oder HMS-PCI. Daher sollten die zu untersuchenden Proteine möglichst N- und C-terminal markiert werden und bei den Experimenten alle denkbaren Kombinationen von Interaktionspaarungen in Betracht gezogen werden. Dies stellt jedoch bei der konventionellen Konstruktklonierung einen erheblichen Aufwand dar. Zu beachten ist auch, dass N- bzw. C-terminales *tagging* eine unterschiedlich hohe Expression der Proteinvarianten zur Folge haben kann (Li 2011).

Bei TAP und HMS-PCI sollte bedacht werden, dass – neben der Störung von PPI durch das *tagging* – schwach gebundene Bindungspartner beim Waschen gelöst werden können oder die Bindung unter den experimentellen Bedingungen erst gar nicht stattfindet (von Mering *et al.* 2002). Bei FLIM wird ein teures konfokales Lasermikroskop benötigt, das räumlich sowie zeitlich hoch sensitiv detektiert. Hier werden große Datensätze generiert, deren Auswertung aufwändig ist (Day 2013). Durch die Synexpression werden direkte PPI nur unzureichend erfasst und es wird – wie bei den *in silico*-Vorhersagen – ein umfangreiches Wissen über die beteiligten Gene, insbesondere zu ihrem biologischen Kontext, benötigt (Marcotte *et al.* 1999).

Erst mit diesem Wissen lassen sich die Qualität der experimentell erhobenen Messdaten und die Validität der daraus aufgestellten Hypothesen beurteilen.

Ziel der Untersuchungen ist es in der Regel, die PPI möglichst vollständig (*coverage*) zu erfassen und dabei möglichst wenig falsch-positive PPI zu generieren (*accuracy*). Dabei weisen die jeweiligen Methoden Unterschiede bzgl. Sensitivität und Spezifität auf. Dieser Sachverhalt wurde in einer Studie genauer untersucht (von Mering *et al.* 2002). Dabei wirkte sich bei den dort untersuchten Verfahren eine Filterung der Daten hinsichtlich ihrer Qualität zumindest auf die *accuracy* positiv aus. Auch die Kombination von zwei oder drei unterschiedlichen Methoden erhöhte die *accuracy*, wobei jedoch die *coverage* abnahm (Abbildung 7).

EINLEITUNG

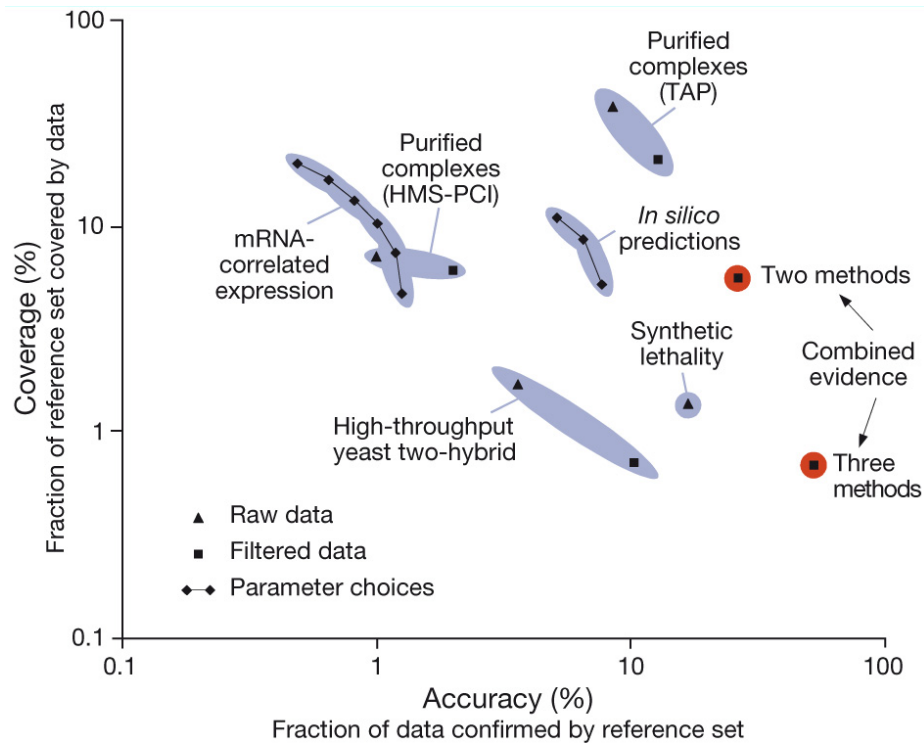


Abbildung 7: Qualität der Daten bei Interaktionsstudien in Abhängigkeit von der Methode

Logarithmische Darstellung von *coverage* und *accuracy* aus Interaktionsdaten unterschiedlicher Studien bzw. Methoden. Jede Markierung (Dreieck oder Viereck) stellt einen Datensatz dar, welcher mit einem Referenzdatensatz von 10.907 bestätigten Interaktionen verglichen wurde. „Two methods“ und „Three methods“ repräsentieren die Anwendung von zwei bzw. drei Methoden an einem Datensatz. (aus von Mehring et al. 2002).

Wichtig erscheint bei Interaktionsstudien auch der Einsatz von Methoden, die dem tatsächlichen Biologischen System möglichst nahekommen, also die Untersuchung von PPI im biologischen Kontext bzw. in der lebenden Zelle. Auf diese Weise können unspezifische und falsch-positive PPI reduziert bzw. dynamische oder kurzzeitige PPI sensibler detektiert werden (von Mering *et al.* 2002).

EINLEITUNG

1.4. Das Peroxisom

Die Peroxisomen wurden 1954 durch Johannes Rhodin im Rahmen seiner Dissertation elektronenmikroskopisch in Tubuluszellen der Mausniere entdeckt und als *micorbodyes* beschrieben (Rhodin 1954). Ihren Namen erhielten sie durch de Duve, der den Umsatz von H_2O_2 durch das Enzym Katalase nachwies (De Duve und Baudhuin 1966). Seitdem wurden sie funktionell und strukturell näher beschrieben, wobei sich zeigte, dass sie eine Vielfalt von Aufgaben erfüllen (siehe 1.4.1).

Peroxisomen kommen in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme von reifen Erythrozyten vor und sind bis zu 1 μm im Durchmesser groß (Moser 1999). Sie unterscheiden sich in Größe und Form, welche zumeist sphärisch ist, sind in der Zelle mobil und können auch eine tubuläre Struktur annehmen. In dieser Gestalt können sie Netze bilden und miteinander verschmelzen (Schrader *et al.* 2000). Daneben können sie sich – abhängig von äußeren Einflüssen – auch hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung und Funktion unterscheiden bzw. bedarfsgerecht anpassen (Subramani 1993).

Die Zahl der Peroxisomen schwankt in menschlichen Zellen von unter 100 bis mehr als 1.000 pro Zelle. Sie werden durch eine Lipidmembran, die eine einzigartige Proteinbestückung aufweist, vom Zytoplasma abgegrenzt. Diese ist für die Aufgaben des Organells essentiell. In der peroxisomalen Matrix liegt ein pH von ca. 8,3 vor und es befinden sich ca. 50 Matrix-Enzyme darin (Gould, S. J. *et al.* 2006).

1.4.1. Funktionen des Peroxisoms

Die Funktionen des Peroxisoms werden größtenteils von den Matrixproteinen erfüllt, jedoch sind auch die Membranproteine daran beteiligt. Neben der H_2O_2 -Entgiftung spielt es eine zentrale Rolle bei der β -Oxidation von Fettsäuren. Die überlangkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA) werden bei Säugetieren nur in diesem Kompartiment zu Acyl-CoA abgebaut (Cooper und Beevers 1969; Lazarow und De Duve 1976). Ebenso findet die α -Oxidation von Fettsäuren wie der Phytansäure nur im Peroxisom statt. Hier muss zunächst das C1-Atom decarboxyliert werden bevor die Fettsäuren in die β -Oxidation eingeschleust werden können (Wanders und Waterham 2006). Die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin erfolgt ebenfalls in den Peroxisomen (Van Veldhoven *et al.* 1992). Auch die Prostaglandin-Synthese findet hier statt (Wanders und Waterham 2006). Daneben werden im Peroxisom Ether-Phospholipide (Plasmalogene) gebildet, die z.B. zum *platelet-activating factor* weiterverarbeitet werden. Auch werden hier Aminosäuren abgebaut und bestimmte Zucker im Pentosephosphat-Zyklus (Wanders und Waterham 2006). Die Glukoneogenese aus Aminosäuren findet hier ebenfalls statt (Noguchi und Takada 1978). In den letzten Jahren wurden dem Peroxisom weitere Funktionen bei der Pheromon-Synthese und der angeborenen viralen Immunabwehr zugeordnet (Dixit *et al.* 2010; Islinger *et al.* 2012).

EINLEITUNG

1.4.2. Biogenese und Vermehrung der Peroxisomen

Die Entstehung der Peroxisomen war seit ihrer Entdeckung über geraume Zeit Gegenstand der Diskussion. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass sie durch Abschnürung vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet werden (Novikoff und Shin 1964; De Duve und Baudhuin 1966). Diesem Ansatz wurde später widersprochen, da sich die Membranzusammensetzung beider Organelle unterscheidet und die meisten peroxisomalen Proteine an freien Ribosomen translatiert würden (Lazarow und Fujiki 1985). Inzwischen scheint jedoch sicher, dass die Peroxisomen einerseits aus dem ER hervorgehen (Hoepfner *et al.* 2005), andererseits auch *de novo* entstehen können (Kunau und Erdmann 1998; Hettema und Motley 2009). Es wurde ein aus drei Schritten bestehendes Modell für die Biogenese der Peroxisomen entwickelt, nämlich (1) Bildung von Membranen und Import von Membranproteinen, (2) Import der Matrixproteine und (3) Wachstum und Teilung (Kunau und Erdmann 1998). Der Import von Membran- und Matrixproteinen spielt bei der Bildung und Reifung von Peroxisomen eine zentrale Rolle (Hettema und Motley 2009). Dies wird in den Kapiteln 1.4.3 bzw. 1.4.4 näher beschrieben. Derzeit ist nicht abschließend geklärt, ob Membranproteine des Peroxisoms an zytoplasmatischen Ribosomen produziert und direkt in die peroxisomale Membran transportiert werden, oder ob sie ins ER transloziert werden und von dort in abgeschnürten Membranvesikeln ans Peroxisom gelangen (Nuttall *et al.* 2011).

Für die *de novo*-Synthese sind drei sogenannte Peroxine, PEX3, PEX16 und PEX19, von entscheidender Bedeutung (Hoepfner *et al.* 2005). Peroxine sind durch die PEX-Gene kodierte für die Biogenese der Peroxisomen essentielle Proteine. Die drei oben genannten Peroxine spielen eine entscheidende Rolle bei der frühen Biogenese dieses Organells. Weist eines von diesen einen Defekt auf, besitzen die Zellen des betroffenen Organismus weder intakte Peroxisomen noch peroxisomale Membranen (sog. *peroxisomal ghosts*). Bei Beheben dieses genetischen Defekts durch Komplementation mit einer intakten Genkopie werden in den betroffenen Zellen jedoch Peroxisomen gebildet (Hoepfner *et al.* 2005). Dass die *de novo*-Synthese auch in gesunden menschlichen Zellen stattfindet konnte bislang nicht gezeigt werden. Derzeit wird davon ausgegangen, dass sich hier Peroxisomen im Wesentlichen durch Wachstum und Teilung vermehren (Hettema und Motley 2009).

Der Prozess von Wachstum und Teilung folgt einer definierten Abfolge bestehend aus Elongation von der sphärischen in eine tubuläre Form, Einschnürung der Membran, gefolgt von der Abschnürung eines Anteils des Organells (Islinger *et al.* 2012). Dabei spielen einzelne Proteine wie das Peroxin PEX11 eine herausragende Rolle (Schrader *et al.* 1998). Die Regulation des Prozesses scheint wesentlich durch Phosphorylierung von PEX11 (Joshi *et al.* 2012) und dessen Dimerisierung bzw. Oligomerisierung gesteuert zu werden (Marshall *et al.* 1996; Opalinski *et al.* 2011). Die Abschnürung der Membranvesikel wird durch Dynamin-ähnliche GTPasen gesteuert, welche spiralförmige Strukturen um die abzuschnürenden Membranen bilden (Praefcke und McMahon 2004).

Interessanterweise besteht zwischen dem Teilungsmechanismus von Peroxisomen und Mitochondrien eine Überlappung hinsichtlich der dafür erforderlichen Proteinausstattung. So

EINLEITUNG

werden die Proteine Fis1 (*mitochondrial fission 1 protein*), Mff (*mitochondrial fission factor*) und PMD1 (*peroxisomal and mitochondrial division factor 1*) in beiden Organellen gefunden (Islinger *et al.* 2012). Die Adapter für die Dynamin-ähnlichen GTPasen, Mdv1 (*glycerol-adapted growth*) und Caf4 (*CCR4 associated factor*) finden sich jedoch nur bei Hefen und anderen einzelligen Eukaryonten (Okamoto und Shaw 2005; Schrader und Yoon 2007; Islinger *et al.* 2012). Auch kann durch experimentelle Fehllokalisierung von PEX3 in die mitochondriale Membran die *de novo*-Synthese von Peroxisomen aus dem Mitochondrium ausgelöst werden (Rucktaschel *et al.* 2010). Dies weist auf eine enge Verbindung zwischen diesen beiden Organellen hin (Camoses *et al.* 2009).

1.4.3. Biosynthese peroxisomaler Membranen und Import von Membranproteinen

Die Lipidmembranen der Peroxisomen entstammen nach aktuellem Kenntnisstand ER-Vesikeln (Geuze *et al.* 2003), die bestimmte peroxisomale Membranproteine (*peroxisomal membrane protein*; PMP) enthalten, jedoch keine Matrixproteine (Diestelkötter und Just 1993; van der Zand *et al.* 2010). Die Rekrutierung dieser an freien zytoplasmatischen Ribosomen translatierten PMP an die ER- bzw. peroxisomale Membran wird durch PEX19 gesteuert. Dies besitzt eine Bindungsstelle für das Peroxisomale Membranprotein Targeting-Signal (mPTS), das die meisten PMP enthalten (Gotte *et al.* 1998). Das mPTS enthält zwei Elemente, nämlich (1) eine PEX19-Bindungsdomäne und (2) eine oder mehrere Transmembrandomänen (Gloeckner *et al.* 2000; Brown und Baker 2003; Landgraf *et al.* 2003). Die PEX19-Bindungsdomäne besteht aus elf konservierten hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren (Rottensteiner *et al.* 2004). Die an PEX19 gebundenen PMP werden in diesem Komplex stabilisiert und zum entstehenden Peroxisom transportiert, wo PEX19 an das integrale Membranprotein PEX3 bindet (Muntau *et al.* 2003; Schliebs und Kunau 2004). Anschließend werden die PMP durch den Sec61-Komplex in die ER-Membran eingebaut (van der Zand *et al.* 2010). Zusätzlich zum hier beschriebenen mPTS-abhängigen Klasse I-Import wurde auch ein von PEX19 unabhängiger Klasse II-Import beschrieben, der von PEX3 abhängt (Jones *et al.* 2004). Bei Defekten von PEX3 bzw. PEX19 funktioniert dieser Importmechanismus nicht und es kommt damit zu einem vollständigen Fehlen von Peroxisomen in den betroffenen Zellen, was als Hinweis auf die Bedeutung dieser beiden Peroxine bei der frühen Biogenese von Peroxisomen gewertet werden muss (Gotte *et al.* 1998; Muntau *et al.* 2000).

1.4.4. Import peroxisomaler Matrixproteine

Ebenso wie die Translation der PMP erfolgt auch die der Matrixproteine des Peroxisoms an freien Ribosomen im Zytoplasma. Diese müssen im Anschluss (1) als peroxisomale Proteine erkannt, (2) zum Peroxisom transportiert und (3) dort in die Matrix des Peroxisoms transloziert werden. Im Anschluss folgen (4) Dislokation und Recycling des verantwortlichen Cargo-Transporters vom Peroxisom (Abbildung 8) (Platta und Erdmann 2007).

EINLEITUNG

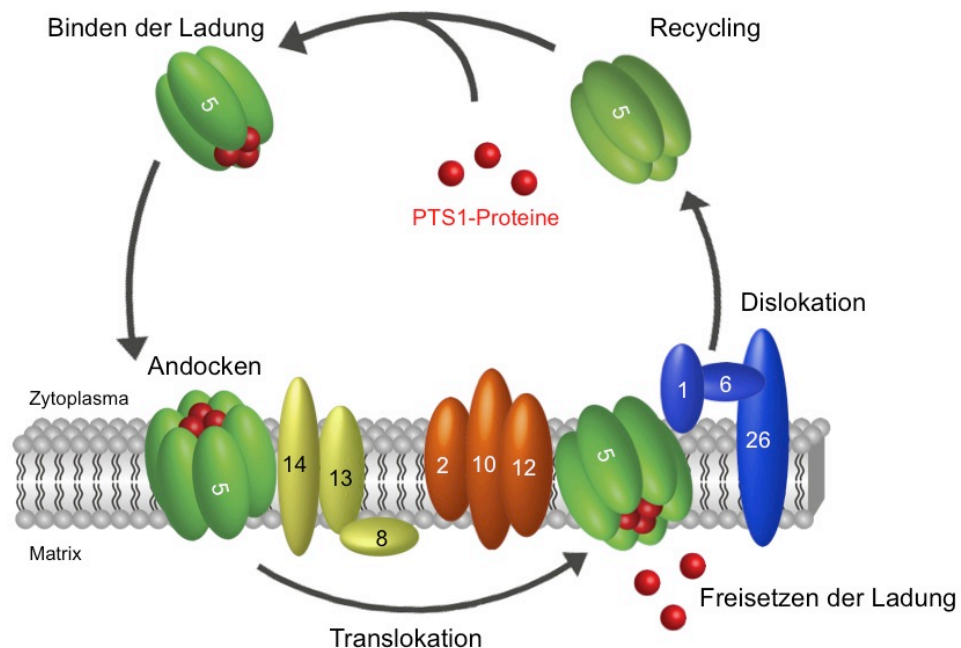


Abbildung 8: Importmechanismus für peroxisomale Matrixproteine mit der PTS1-Targeting-Sequenz

PTS1-Proteine binden an den zytosomatischen PTS1-Rezeptor Pex5p. Dieser dockt an den *docking complex* der peroxisomalen Membran bestehend aus Pex13p und Pex14p an und transloziert seine Ladung zur Matrix, wo sie freigesetzt wird. Der Import der Ladung (Kargo) erfolgt vermutlich unter Beteiligung der drei Ring-Finger-Proteine Pex2p, Pex10p und Pex12p. Der Rezeptor gelangt anschließend auf noch ungeklärtem Weg durch die Membran ins Zytosol zurück, wobei Pex1p, Pex6p und Pex26p für die Dislokation verantwortlich sind (Platta und Erdmann 2007). Die Zahlen stehen jeweils für die entsprechenden Peroxine; PTS = *peroxisomal targeting signal*.

Für die Erkennung peroxisomaler Proteine an den freien Ribosomen sind zwei Signalsequenzen PTS1 (*peroxisomal targeting signal*) und PTS2 verantwortlich. PTS1 ist am C-Terminus der meisten Matrixproteine lokalisiert und besteht aus drei Aminosäuren. Zunächst wurde die Sequenz Serin-Lysin-Leucin (S-K-L) entdeckt (Gould, S. G. *et al.* 1987), später kamen zahlreiche weitere Varianten hinzu (S, A, C)-(K, R, H)-(L, M) (Lametschwandtner *et al.* 1998). PEX5 ist der Kargo-Transporter für Proteine mit PTS1-Sequenz, welcher diese erkennt, bindet und zum Peroxisom transportiert. Wesentlich seltener als PTS1 kommt PTS2 vor, welches am N-Terminus oder innerhalb der Matrixporteine lokalisiert sein kann. Auch hier sind mehrere Varianten bekannt, (R, K)-(L, I, V)-X5-(H, Q)-(L, A), wobei „X5“ für fünf beliebige Aminosäuren steht (Swinkels *et al.* 1991; Legakis und Terlecky 2001). Der Kargo-Transporter für diese Proteine ist PEX7. Da einzelne Matrixporteine keine dieser beiden PTS besitzen, wird die Existenz eines non-PTS-Importmechanismus angenommen, der ebenfalls von PEX5 abhängt (van der Klei und Veenhuis 2006).

Der PTS1-Kargorezeptor PEX5 kommt in zwei Formen vor, nämlich vorwiegend im Zytosol gelöst aber auch integriert in die peroxisomale Membran (Girzalsky *et al.* 2010). PEX7 hingegen

EINLEITUNG

bindet PTS2-Proteine und transportiert diese zum Peroxisom (Marzioch *et al.* 1994). Für seine Importfunktion benötigt es beim Menschen und in Pflanzen die Splice-Variante PEX5L als Bindungspartner (Otera *et al.* 2000). Bei PEX5-Defekten kommt es somit zu einem Fehlen von Matrixproteinen im Peroxisom.

Die beiden löslichen PTS-Rezeptoren PEX5 und PEX7 binden ihre Kargoproteine im Zytosol und transportieren sie zur peroxisomalen Membran. Dort binden sie beim Menschen an PEX13 und PEX14, womit der *docking complex* entsteht, der die Bildung einer Membranpore induziert, deren Kern aus PEX5 und PEX14 besteht und im Durchmesser bis zu 9 nm messen kann (Meinecke *et al.* 2010). Das Peroxin PEX8 kann PEX5 und PEX7, jedoch auch den RING-Finger-Komplex bestehend aus PEX2, PEX10 und PEX12 binden. Es befindet sich auf der Matrix-Seite der Membran und ist vermutlich für die Kargo-Freisetzung verantwortlich. Die Dislokation von PEX5 aus der Membranpore wird im Anschluss durch die AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 vermittelt, die an das integrale Membranprotein PEX26 gebunden sind (Platta *et al.* 2005). Der RING-Finger-Komplex ist neben der Kargo-Freisetzung auch an der Ubiquitinierung von PEX5 und damit an dessen Recycling sowie Abbau im Proteasom beteiligt (Girzalsky *et al.* 2010).

1.4.5. Die Peroxine PEX3 und PEX19

Wie in den Kapiteln 1.4.2 und 1.4.3 beschrieben spielen die Peroxine PEX3 und PEX19 eine entscheidende Rolle bei der frühen Biogenese des Peroxisoms. Dabei ist PEX19 der zytoplasmatische Rezeptor für PMP, welche durch Bindung an PEX19 stabilisiert werden. PEX3 ist ein integrales Membranprotein (Kammerer *et al.* 1998) und der PEX19-Rezeptor in der peroxisomalen Membran (Hoepfner *et al.* 2005). Die Interaktion der beiden Peroxine wurde bereits beschrieben und findet über eine eigene Docking-Domäne in PEX19 statt. Nach Bindung von PEX19 mit gebundenen PMP an PEX3 werden diese in die peroxisomale Membran inseriert (Muntau *et al.* 2003; Nuttall *et al.* 2011).

Infolge neuerer Erkenntnisse zur Herkunft der Peroxisomen aus dem ER und der in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen an PEX3 und PEX19 wurde ihre Funktion durch eine neue Hypothese ergänzt. PEX19 bindet mPTS-haltige PMP im Zytosol und transportiert diese zum ER, wo sie nach Bindung an PEX3 in die ER-Membran inseriert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass PEX3 und PEX19 auch für die Sortierung bestimmter PMP zum Export aus dem ER ins Peroxisom verantwortlich sind (Tabak *et al.* 2013).

1.4.6. Das Peroxin PEX26

PEX26 wurde erst 2003 als verantwortliches Gen für die Komplementationsgruppe 8 entdeckt (Matsumoto *et al.* 2003a). Es handelt sich dabei um ein aus 305 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein mit einem C-terminalen Transmembransegment, welches dieses in der peroxisomalen Membran verankert. Bereits in der genannten Arbeit wurde es als Bindungspartner für den PEX1/PEX6-Komplex am Peroxisom beschrieben. Damit ist es am Import von PMP in die

EINLEITUNG

peroxisomale Membran und insbesondere an der Freisetzung von peroxisomalen Matrix-Proteinen durch PEX5 bzw. an der Dissoziation von PEX5 vom Peroxisom und dessen Recycling beteiligt. In die peroxisomale Membran wird PEX26 mittels PEX19 importiert, mit welchem es eine PPI eingeht (Halbach *et al.* 2006).

Es bestehen Hinweise darauf, dass Instabilität von PEX26, ungenügende Bindung an den PEX1/PEX6-Komplex und eine Fehllokalisation von PEX26 für die Pathogenese verantwortlich sein können (Furuki *et al.* 2006). Bemerkenswert ist die ausgeprägte phänotypische Heterogenität bei Vorliegen von Mutationen im *PEX26*-Gen. Diese können zu allen drei möglichen Erkrankungen des Zellweger-Spektrums, nämlich Zellweger-Syndrom (ZS), Neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und Infantiles Refsum-Syndrom (IRD) führen (Matsumoto *et al.* 2003b). Derzeit sind 22 Mutationen im *PEX26*-Gen bekannt (Ebberink *et al.* 2011). Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu diesen besteht nicht und es ist nicht bekannt, wie die PEX26-Funktion beim PTS1-Import von Matrixproteinen die Variabilität bei der Manifestation der Erkrankungen verursacht. Dies lässt vermuten, dass PEX26 neben dieser Funktion weitere Aufgaben besitzt, zumal eine zytoplasmatisch und im ER lokalisierte Splice-Variante (PEX26 Δ ex5) existiert, die PEX26-Defektzelllinien weitgehend komplementieren kann (Weller *et al.* 2005).

1.4.7. Der peroxisomale ABC-Transporter ABCD1

ABC-Transporter sind Transmembranproteine, die eine ATP-bindende Domäne besitzen, aus der sich ihr Name ableitet (*ATP binding cassette*). Sie transportieren in Eukaryonten ihre Substrate durch ATP-Hydrolyse aus dem Zytoplasma in Zellorganellen oder aus der Zelle hinaus. Derzeit sind beim Menschen ca. 50 Kandidaten dieser Superfamilie bekannt, welche sich den sieben Subfamilien ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF und ABCG zuordnen lassen (Mo und Zhang 2009).

Das Peroxisom besitzt die vier Transporter der Subfamilie ABCD, nämlich ABCD1 (Adrenoleukodystrophie-Protein; ALDP), ABCD2 (*ALD-related protein*; ALDRP), ABCD3 (PMP70) und ABCD4 (PMP69). Bei diesen Proteinen handelt es sich – im Gegensatz zu vielen anderen ABC-Transportern – um sogenannte Halbtransporter. Sie erfüllen ihre Funktion erst durch Bildung von Dimeren. Dazu sind zwei Transmembrandomänen (TMD) bestehend aus sechs α -Helices und zwei hydrophile Domänen, welche die ATP-bindende Kasette beinhalten, notwendig (Wanders *et al.* 2007). Die peroxisomalen Halbtransporter bilden Homo-, zum Teil aber auch Heterodimere.

ABCD1 wurde als zweiter peroxisomaler ABC-Transporter beschrieben und der X-chromosomal vererbten Adrenoleukodystrophie (XALD) zugeordnet (Mosser *et al.* 1993). Dieses Protein wird durch Interaktion mit PEX19 in die peroxisomale Membran eingebaut (Gloeckner *et al.* 2000) und ist am Import der Koenzym-A-Ester der VLCFA in die peroxisomale Matrix beteiligt (Wanders *et al.* 2007).

EINLEITUNG

1.4.8. Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen

Erkrankungen des Peroxisoms können auf Störungen der Biogenese oder einzelner Membran- bzw. Matrixproteine beruhen (Wanders und Waterham 2005). Die peroxisomalen Biogenese-Defekte (PBD) können durch vier verschiedene Erkrankungen manifest werden, nämlich als Zellweger-Syndrom (ZS), Neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), Infantile Refsum-Erkrankung (IRD) oder Rhizomele Chondrodysplasia punctata (RCDP). Von diesen Erkrankungen werden ZS, NALD und IRD als sogenanntes Zellweger-Spektrum subsummiert. Bei Säugetieren sind 16 Peroxine bekannt, von diesen sind 14 für PBD verantwortlich, wobei sie sich 12 Komplementationsgruppen zuordnen lassen (Braverman *et al.* 2013). Die Peroxine PEX11 α und PEX11 γ verursachen keine PBD, PEX7-Defekte führen durch Störung des PTS2-Imports zu RCDP und die übrigen Peroxine können für alle Erkrankungen aus dem Zellweger-Spektrum verantwortlich sein. Die Inzidenz der PBD liegt in Nordamerika bei ca. 1:50.000 (Steinberg *et al.* 2006). Biochemisch kommt es bei diesen Patienten zu einer Akkumulation von VLCFA, Gallensäuren und Phytansäure im Blut und zu verminderten Plasmalogenkonzentrationen im Gewebe.

Das ZS wird auch Zerebro-Hepato-Renales Syndrom genannt und beinhaltet eine Reihe von Fehlbildungen. Die Betroffenen fallen bereits im Neugeborenenalter durch charakteristische kraniofaziale Dysmorphie (hohe Stirn, weite anteriore Fontanelle, Hypertelorismus, Epikanthusfalte, hoher Gaumenbogen und Mikrognathie), Hypotonie und Krampfanfälle auf. In Magnet-Resonanz-Tomographie-Aufnahmen des Gehirns zeigen sich Pachygyrie, Polymikrogyrie und Heterotopien als Folge einer Neuromigrationsstörung (Barkovich und Peck 1997). Das Auge kann durch Katarakt, Glaukom, Opticus-Atrophie und Retinitis pigmentosa betroffen sein; ebenso kommt es häufig zu Taubheit. Die Leber zeigt eine Hepatomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen und Gerinnungsstörungen. An den Nieren finden sich Zysten, auch kann es zu Chondrodysplasia punctata an den Hüft- und Kniegelenken kommen. Meist überleben die Betroffenen das Säuglingsalter nicht (Braverman *et al.* 2013).

NALD und IRD manifestieren sich nach dem Neugeborenenalter durch Hypotonie, Gedeihstörung, Krampfanfälle, Seh- bzw. Hörschwäche oder Cholestase. Auch Fehlbildungen des Gesichtes sind vorhanden, jedoch schwächer ausgeprägt als beim ZS. Zusätzlich zu den beim ZS beschriebenen Veränderungen in der ZNS-Bildgebung fällt oft bereits in der frühen Kindheit bei der NALD eine Leukodystrophie durch Demyelinisierung auf, welche zu psychomotorischer Regression und zum Tod im Kindesalter führt (Braverman *et al.* 2013).

Inzwischen wurden Patienten mit atypischen Erkrankungsverläufen aus dem Zellweger-Spektrum beschrieben, die typische Zeichen dieser Erkrankungsgruppe aufweisen, deren intellektuelle Fähigkeiten jedoch im Normbereich liegen. Bei diesen Individuen konnte teilweise eine Restfunktion der betroffenen Peroxine nachgewiesen werden (Steinberg *et al.* 2009; Sevin *et al.* 2011).

Die RCDP ist bereits im Neugeborenenalter durch Verkürzung der proximalen langen Röhrenknochen erkennbar. Der Schädel weist ein hypoplastisches Mittelgesicht mit tief sitzender,

EINLEITUNG

kleiner Nase und mitunter eine Gaumenspalte auf. Es kommt bei Geburt oder bald darauf zu Katarakt, Krampfanfällen, psychomotorischer Retardierung und Wachstumsstörungen; auch angeborene Herzfehler treten gehäuft auf. In Röntgenaufnahmen können im Bereich der Epiphysen Kalkstippchen gesehen werden. Das Gehirn weist eine Reduktion von Neuronen und weißer Substanz auf. Die Patienten überleben zumeist bis ins Erwachsenenalter (Braverman *et al.* 2013).

Bei Defekten einzelner PMP oder Matrixproteine kommt es jeweils zu Erkrankungen, die auf diesem individuellen Defekt beruhen. Bei Defekten von ABCD1 (siehe 1.4.7) kommt es zur XALD. Hierbei handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung, die in unterschiedlichen Altersstufen auftreten kann. Dabei werden die rasch verlaufende kindlich-zerebrale ALD, die jugendlich-zerebrale ALD und die erwachsenen-zerebrale ALD voneinander unterschieden. Daneben werden im Erwachsenenalter auch die Adrenomyeloneuropathie (AMN) und deren Sonderform mit rein zerebraler Demyelinisierung (AMN-C) gefunden. Die Erkrankung betrifft aufgrund des X-chromosomalen Erbganges v.a. Männer, die an Nebennierenrinden-Insuffizienz, Myelopathie oder fulminanter zerebraler Demyelinisierung erkranken. Im Plasma und den Geweben finden sich erhöhte VLCFA-Konzentrationen (Engelen *et al.* 2012). Ein Großteil der heterozygoten Überträgerinnen entwickelt jedoch aufgrund einer Favorisierung des gesunden Allels bei der X-Inaktivierung bis zum 60. Lebensjahr ebenfalls Symptome (Maier *et al.* 2002).

EINLEITUNG

1.5. Zielsetzung der Arbeit

PPI können einen wesentlichen Beitrag für das Verständnis der Funktion von Proteinen leisten, da sie helfen, diese in ihren biologischen Kontext einzuordnen. Bei genetischen Erkrankungen kommt es häufig durch Fehlfaltung oder Denaturierung der betroffenen Proteine zu einer Störung der Interaktion und daraus resultierenden Schäden. Somit tragen PPI zum Verständnis genetischer Erkrankungen bei.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits die Interaktionen der Peroxine PEX3 und PEX19 sowie der peroxisomalen Halbtransporter mit PEX19 untersucht (Gloeckner *et al.* 2000; Muntau *et al.* 2003; Muntau *et al.* 2004). Dies war mittels GST (*glutathione-S-transferase*) *pull-down assay* bzw. FRET vorgenommen worden, was jedoch *in vitro* geschah bzw. im Falle von FRET ein konfokales Lasermikroskop und die Auswertung großer Datensätze erforderlich machte.

Ziele dieser Arbeit waren, eine Methode zur PPI-Untersuchung zu entwickeln, die

- (A) durch *in vivo*-Untersuchungen helfen sollte, die Relevanz der PPI in ihrem biologischen Kontext zu beleuchten.
- (B) Für die Anwendung dieses Verfahrens bei der systembiologischen Untersuchung von Interaktomen sollte die Methode Hochdurchsatz-fähig aufgebaut werden.

Um diese beiden Ziele zu erreichen, sollte ein BRET-System

- (1) hinsichtlich Expression und Quantenausbeute seiner Reporter in Säugetierzellen optimiert werden.
- (2) Zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse sollten die BRET-Reporter jeweils N- und C-terminal an jedes zu untersuchende Protein gekoppelt werden.
- (3) Die Klonierung sowie
- (4) die Transfektion der Expressionskonstrukte sollten im Hochdurchsatz umgesetzt werden.
- (5) Die Detektion an lebenden Zellen sollte mittels eines speziellen *in vivo*-Substrates erfolgen und
- (6) automatisiert durchgeführt werden.
- (7) Die Auswertung der Daten sollte anhand bioinformatischer Berechnungen und Algorithmen ebenfalls automatisiert werden.

Die Validierung des Verfahrens sollte anschließend an bekannten PPI in verschiedenen zellulären Kompartimenten angewandt und bei der Suche nach neuen PPI und bei deren Charakterisierung eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *pro analysi*-Qualität von den Firmen Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™/Gibco® (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen.

2.1.2. Allgemeine Puffer und Lösungen

Das bidestillierte Wasser (H₂O bidest.) für die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurde aus der Apotheke des Klinikum der Universität München, Campus Innenstadt, bezogen. Nachfolgend eine Auflistung dieser Puffer und Lösungen:

| Puffer | Zusammensetzung |
|------------|---|
| PBS | 10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH=7,4 |
| TBE-Puffer | 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH=8,0 |
| TE-Puffer | 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0 |

2.1.3. Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Hersteller |
|---|--|
| <i>E. coli</i> DH5α | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™ (Darmstadt) |
| XL1-Blue Supercompetent Cells | Agilent Technologies/Stratagene (Waldbronn) |
| One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant Cells | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™ (Darmstadt) |
| Fusion-Blue™ Competent Cells | Takara Bio Europe/Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |

MATERIAL & METHODEN

2.1.4. Anzuchtmedien für Prokaryonten

| Medium | Zusammensetzung | Anmerkung |
|--------------------------|---|--|
| SOC-Medium | Hefeextrakt 0,5%, Trypton 2%, Natriumchlorid 10 mM, Kaliumchlorid 2,5 mM, Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM | In H ₂ O bidest. herstellen und nach dem Autoklavieren 20 mM Glucose zugeben |
| LB-Medium | Hefeextrakt 0,5%, Pepton 1%, NaCl 1%, pH=7,4 | In H ₂ O bidest. herstellen und danach autoklavieren |
| Selektive LB-Agarplatten | LB-Medium, Agar 2%, Antibiotikum (siehe 2.2.1.1) | Ad 1000 ml LB-Medium, autoklavieren, Zugabe des Antibiotikums nach Abkühlung auf unter +50°C |

2.1.5. Eukaryontische Zell-Linien

Bei den COS-7 Affennieren-Zellen (Abcam plc, Cambridge, UK) handelt es sich um Fibroblasten-ähnliche Zellen aus der Linie CV-1, welche von der Afrikanischen Grünmeerkatze stammen. Diese wurden mit dem SV40 (Simian Vacuolating Virus 40) transformiert und enthalten somit das *large T-antigen*, welches die Replikation von Expressionskonstrukten mit SV40-Promotor in diesen Zellen ermöglicht. In der Zellkultur wachsen sie adhärent an Glas- und Kunststoffoberflächen.

2.1.6. Medien und Antibiotika für die eukaryontische Zellkultur

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit Phenolrot | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Fetales Kälberserum (FCS) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Antibakterieller Zusatz: Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml | Life Technologies TM GmbH/Gibco®, Darmstadt |

MATERIAL & METHODEN

2.1.7. Enzyme zur DNA-Modifikation

| Enzym | Hersteller |
|---|---|
| SacI | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| CcrI (<i>Xho</i> I), HpaI (<i>Ksp</i> AI), PmeI (<i>Mss</i> I) | Fermentas/Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Shrimp Alkaline Phosphatase | Fermentas/Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| T4 DNA Ligase | Fermentas/Fisher Scientific GmbH, Schwerte |

2.1.8. Eingesetzte Materialien für die DNA-Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse wurde das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems® (Life Technologies™ GmbH, Darmstadt) verwendet.

2.1.9. Längen- und Molekulargewichtsstandards

| Produktname | Hersteller |
|-------------------------------|--|
| 1 Kb DNA Ladder | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™, Darmstadt |
| DNA Molecular Weight Marker V | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim |

2.1.10. Reagenzien für die horizontale gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

| Produktname | Hersteller |
|--|--|
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Ethidiumbromid Dropper Bottle 0,625 g/ml | Olerup SSP AB, Stockholm (Schweden) |
| Gel Loading Solution (6x) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| TBE-Puffer | (siehe 2.1.2) |

2.1.11. Primäre und sekundäre Antikörper sowie Nachweisreagenzien für die Immunfluoreszenz

| Produkt | Herkunft | Hersteller |
|--------------------------------------|-----------------------|--|
| Anti-Catalase Antibody | Kaninchen, polyklonal | Biodesign, Saco (Maine, USA) |
| Rhodamine AffiniPure Anti-Rabbit IgG | Maus | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket (UK) |
| Vectashield Mounting Medium H-1000 | | Vector Laboratories Ltd., Peterborough (UK) |

MATERIAL & METHODEN

2.1.12. Geräte, Reagenzien und Material zur Transfektion

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Amaya™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System | Lonza, Köln |
| Amaya Nucleofector® II | Lonza, Köln |
| SE Cell Line 96-well Nucleofector Kit | Lonza, Köln |
| Corning® 96 Well Flat Clear Bottom White Polystyrene TC-Treated Microplates | Corning GmbH, Kaiserslautern |
| µ-slides VI Collagen IV | ibidi GmbH, Martinsried |
| RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin ohne Phenolrot, plus 10% FCS und 1% antibakteriellen Zusatz | PAA Laboratories GmbH, Cölbe und siehe 2.1.6 |

2.1.13. Vektoren und Plasmide

| Plasmid | Hersteller |
|----------------------|--|
| pcDNA™6.2/N-YFP-DEST | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™ (Darmstadt) |
| pcDNA™6.2/C-YFP-DEST | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™, Darmstadt |
| pDONR™ | Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™, Darmstadt |
| pRL-SV40 | Promega GmbH, Mannheim |
| phRG-TK | Promega GmbH, Mannheim |
| pEYFP-N1 | Clontech/Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich) |

2.1.14. Substrate für Lumineszenz- und BRET-Messungen

| Substrat | Hersteller |
|------------------------------|-----------------------------|
| ViviRen™ Live Cell Substrate | Promega GmbH, Mannheim |
| Coelenterazin | PJK GmbH, Kleinblittersdorf |

2.1.15. Gerät zur High Throughput-Detektion

Die BRET-Detektion erfolgte mittels des Multiwellreaders LUMIstar OPTIMA von BMG LABTECH GmbH (Ortenberg). Dieses Plattenlesegerät kann sowohl kurzzeitige blitzartige als auch kontinuierliche Lumineszenzsignale hoch sensitiv detektieren. Dabei können Signale nicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern auch kumulativ über einen definierten Zeitraum oder als

MATERIAL & METHODEN

Real Time-Kinetik aufgezeichnet werden. Mithilfe des „Multiple Wavelength Mode“ können diese auch parallel in zwei Kanälen aufgezeichnet werden („Simultaneous dual Emission Detection“) – eine Grundvoraussetzung für die hier vorgenommenen BRET-Messungen.

Über frei wählbare Filter lassen sich die Messungen in bestimmten Spektralbereichen durchführen. In dieser Arbeit wurde im Luziferase-Kanal bei 475 nm (30 nm *full width at half maximum*, FWHM) und im BRET-Kanal bei 535 nm (30 nm FWHM) detektiert. Reagenzien, wie beispielsweise Substrate oder Puffer, werden durch Injektoren automatisiert zu den Messansätzen gegeben. Das Gerät lässt sich über die Software-Schnittstelle auch in Roboter-Systeme einbinden.

2.1.16. Gerät zur Detektion des Energietransfers am Spektrophotometer (BRET-Scan)

Die Detektion des Biolumineszenz- bzw. BRET-Signals im Spektralbereich von 400 bis 600 nm erfolgte am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse von Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG (Waldbronn). Der PMT-Detektor des Geräts kann neben Fluoreszenz auch Biolumineszenz detektieren.

2.1.17. Fluoreszenzmikroskop und Fluoreszenzfilter

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das inverse Mikroskop Zeiss Axiovert 135 der Carl Zeiss AG (Oberkochen) verwendet. Der für die hier vorgenommenen Messungen passende Filtersatz enthielt die beiden Filter für YFP und Cy3, welche für die Darstellung von Venus bzw. TRITC eingesetzt wurden:

| | Exzitationsfilter | Dichroitischer Spiegel | Emissionsfilter |
|-----|-------------------|------------------------|-----------------|
| YFP | 500/20 | 515 DCLP | 535/30 |
| Cy3 | 548/10 | 565 DCLP | 630/60 |

Bei den genannten Exzitations- und Emissionsfiltern gibt die linke Zahl die zentrale Wellenlänge in nm an, die rechte Zahl gibt die nutzbare Bandbreite an. Die Zahl bei den dichroitischen Spiegeln gibt die Wellenlänge an, bei welcher 50% des einfallenden Lichtes durchgelassen bzw. reflektiert werden (50%-Transmissionspunkt). Somit eignen sie sich als Strahlteiler zwischen Exzitations- und Emissionsfiltern zur Steigerung der Exzitation bei gleichzeitiger Reduktion von Störsignalen im Emissionsstrahlengang aus dem Exzitationsbereich. DCLP steht für dichroitischer Langpass. Dies bedeutet, dass der Filter langwelliges Licht durchlässt, hingegen kurzwelliges blockiert.

MATERIAL & METHODEN

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Anzucht von *Escherichia coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden über Nacht bei 37°C auf einem Rundschüttler in LB-Medium herangezogen. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben, Falcon™-Tubes oder auf selektiven LB-Agarplatten. Dabei wurden je nach Bedarf folgende Antibiotika zugesetzt:

| Antibiotikum | Konzentration | Plasmid |
|-----------------|---------------|---|
| Ampicillin | 50 µg/ml | DEST-Vektoren, <i>expression clones</i> , BRET-Positivkontrollen, pRL-SV40, phRL-TK |
| Chloramphenicol | 30 µg/ml | DEST-Vektoren, <i>expression clones</i> |
| Kanamycin | 50 µg/ml | pDONR™, <i>entry clones</i> , pRLuc-N1, pEYFP-N1 |

Die Ernte der *E. coli* erfolgte durch Zentrifugation für 10-15 min bei 3400 U/min und +4°C.

2.2.1.2. *Escherichia coli* Dauerkulturen

Für die langfristige Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden je 0,5 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml 85%igem sterilem Glycerol suspendiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.2.1.3. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Transformation ist die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien und wurde bereits vor Entdeckung der DNA beschrieben (Avery *et al.* 1944). Für die Vervielfältigung und Klonierung von DNA mittels Plasmiden ist diese Methode unerlässlich.

Die Transformation von DNA in *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. Dabei unterschieden sich die Bedingungen für die einzelnen Zelllinien etwas:

| | XL1-Blue Cells | ccdB Survival Cells | DH5α | Fusion-Blue™ Cells |
|---------------|----------------|---------------------|------------|--------------------|
| Zellvolumen | 50 µl | 50 µl | 100 µl | 50 µl |
| DNA-Menge | 0,1 – 50 ng | 10 pg – 100 ng | 1 – 5 µl * | 2,5 µl ** |
| Hitzepuls | 45 s | 30 s | 90 s | 45 s |
| Abkühlung | 2 min | 2 min | 2 min | 1 min |
| Präinkubation | 500 µl LB | 250 µl SOC | 200 µl LB | 450 µl SOC |

* 1 µl aus BP- bzw. LR-Reaktion oder 5 µl aus Ligationsansätzen

** 2,5 µl aus dem In-Fusion Reaktionsgemisches

MATERIAL & METHODEN

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von Plasmid-DNA und β -Mercaptoethanol (1,7 μ l, 1,42 M) für 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation der Plasmid-DNA in das Bakterium wurde die Bakteriensuspension im Anschluss für einen definierten Zeitraum einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und danach kurz auf Eis inkubiert. Es folgte durch Zugabe von LB- oder SOC-Medium zur Bakteriensuspension die Präinkubation über eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler. Anschließend wurde der Ansatz auf selektive LB-Agarplatten ausplattiert. Während der Inkubation über Nacht bei 37°C wuchsen nur die *E. coli*-Zellen zu Kolonien heran, welche das Resistenzgen aus dem aufgenommenen Plasmid trugen (siehe 2.2.1.1).

2.2.1.4. Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen

2.2.1.4.1. Miniprep von Plasmid-DNA

Für den DNA-Miniprep verwendeten wir das QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN Hamburg GmbH und gingen gemäß Herstellerprotokoll vor. Der DNA-Miniprep ermöglicht die Isolierung von Plasmid-DNA aus rekombinanten *E. coli*-Bakterien.

Die Bakterien werden zunächst unter alkalischen Bedingungen lysiert, dann wird das Lysat im Anschluss neutralisiert. Es folgt die Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikatmatrix bei hohen Salzkonzentrationen. Nach Elution in H₂O bidest. oder TE-Puffer und Entfernung dieser Salze können so aus 5 ml Übernachtskulturen bis zu 25 μ g Plasmid-DNA extrahiert werden.

2.2.1.4.2. Midi- bzw. Maxiprep von Plasmid-DNA

Mittels Midi- bzw. Maxiprep können größere Mengen (Midi: 100 μ g aus 50 ml Bakterienkultur, Maxi: 500 μ g aus 250 ml *E. coli*-Kultur) und eine reinere Qualität von Plasmid-DNA für die Transfektion in eukaryontische Zellen gewonnen werden. Wir verwendeten die Produkte QIAfilter Plasmid Midi Kit und QIAfilter Plasmid Purification Maxi-Kit und gingen nach Herstellerangaben vor.

Anders als beim Miniprep wird bei diesem Verfahren die Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Da dies bei hoher Salzkonzentration erfolgt, muss die DNA nach der Elution aus dieser Säule mittels Zentrifugation (17.000 g, 30 min) in Isopropanol gefällt werden. Es folgt eine Aufreinigung mit 70%igem Ethanol. Anschließend wird das DNA-Pellet für 15 min bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Schließlich wird das DNA-Pellet in H₂O bidest. aufgenommen und es folgt nach Lagerung über Nacht bei 4°C die photometrische DNA-Quantifizierung.

MATERIAL & METHODEN

2.2.1.5. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Quantifizierung erfolgte an einem NanoDrop von Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot). Dieses Fluorospektrometer kann die DNA-Konzentration in einem Probenvolumen von 1 µl bestimmen. Dabei wird die Extinktion bei 260 nm gemessen und anhand des Umrechnungsfaktors (Extinktion = 1,0 entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA) in die DNA-Konzentration der Probe umgerechnet.

Um eine Proteinkontamination auszuschließen wird auch bei 280 nm gemessen und der Quotient 260 nm/280 nm gebildet. Dieser Quotient sollte bei ca. 1,8 liegen; ist er niedriger, liegt eine Kontamination durch Proteine vor und die DNA ist für die Transfektion in eukaryonte Zellen ungeeignet.

2.2.1.6. Horizontale Gelelektrophorese im Agarosegel

Die DNA-Gelelektrophorese trennt DNA-Moleküle im Agarosegel entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld auf. Es wurden in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente 0,5%- bis 2,5%-Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 100 ml TBE-Puffer für zwei Minuten gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Zielkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und das Gel in eine horizontale Wanne gegossen. Die Polymerisierung bei Abkühlung dauerte bei Raumtemperatur ca. 30 min.

Nach Mischung der DNA-Proben mit Gel Loading Solution wurden die DNA-Fragmente bei 100 V und etwa 100 mA für ca. 1 h im elektrischen Feld aufgetrennt. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert dabei in die DNA-Helix und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. So werden DNA Fragmente im Gel sichtbar. Ihre Länge lässt sich anhand eines Molekulargewichts-Standards abschätzen, der bei jeder Gelelektrophorese mitgeführt wird. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele während der UV-Belichtung fotografiert.

2.2.1.7. Aufreinigung und Gelelution von DNA

Für die weitere Verarbeitung von DNA-Fragmenten nach einer PCR, einem Restriktionsverdau oder der Gelelektrophorese müssen diese von Primern, Puffern, Salzen oder Proteinen gereinigt werden. Wir verwendeten dafür die Systeme QIAquick PCR Purification Kit und QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN Hamburg GmbH und gingen entsprechend den Herstellervorgaben vor. Die DNA-Fragmente von ca. 100 bp bis 10 kb werden bei dieser Prozedur an eine Silikatmatrix gebunden und nach Zugabe von TE-Puffer oder H₂O bidest. aus dem Säulchen eluiert.

2.2.1.8. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen aus Prokaryonten erkennen spezifische doppelsträngige DNA-Sequenzen, zumeist Palindrome, und hydrolysieren die Phosphodiesterbindung zwischen zwei

MATERIAL & METHODEN

Basen. Dabei können DNA-Fragmente mit bzw. ohne einzelsträngigen Überhang (*sticky ends* bzw. *blunt ends*) entstehen. Wichtig sind diese Enzyme für die konventionelle Klonierung von Konstrukten.

Jeweils 0,5 bis 2 µg Plasmid oder gereinigtes PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen den jeweiligen Herstellerangaben entsprechend geschnitten. Dabei wurden die Reaktionsansätze im Wasserbad bei 37°C für 1 h (*sticky ends*) bzw. 16 h (*blunt ends*) inkubiert. Anschließend wurden ca. 5-10% der Ansätze in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der Produkte zu überprüfen.

2.2.1.9. Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Enden

Nach dem Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten (siehe 2.2.1.8) wurden vor der Ligation (siehe 2.2.1.10) deren Enden dephosphoryliert. Dies geschah mittels 3 U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Fermentas/Fisher Scientific GmbH (Schwerte) pro 1 pmol DNA-Termini. Dabei wurden die Vektoransätze in SAP-Puffer für 1 h (*sticky ends*) oder über Nacht (*blunt ends*) bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden die DNA-Fragmente über Kieselgel-Säulchen oder per Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 2.2.1.7).

2.2.1.10. Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten verwendeten wir die T4 DNA Ligase von Fermentas/Fisher Scientific GmbH (Schwerte). Vektor bzw. Insert wurden jeweils in einem molaren Verhältnis von etwa 1:5 eingesetzt, wobei ca. 100 ng Vektor-DNA verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 22°C. Bei *blunt end*-Ligationen wurden 5% Polyethylenglykol (PEG) 4000 zugesetzt. Die Ligase wurde schließlich durch Inkubation bei 70°C über 20 min inaktiviert.

2.2.1.11. PCR-Amplifikation

2.2.1.11.1. Expand High Fidelity PCR System

Das Expand High Fidelity PCR System von Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim) wurde für die Erstellung von DNA-Fragmenten bis 5 kb verwendet, da es neben der Taq- auch die Tgo DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität beinhaltet. Dabei wurden entsprechend den Herstellerangaben 2,5 U DNA-Polymerase, 100 ng Template und jeweils 15 pmol Primer eingesetzt. Die Primer wurden anhand des Online Tools „Oligonucleotide Properties Calculator“ der Northwestern University Chicago (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) erstellt und bei der Firma Metabion GmbH (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

Wir führten zumeist eine zweistufige PCR durch. Nach einer initialen Denaturierung der DNA bei 96°C über 2 min folgten zehn Zyklen bestehend aus jeweils 15 s Denaturierung bei 96°C, gefolgt von 30 s Annealing bei 45 bis 68°C (abhängig von der Primer-Struktur und -Länge) und 1 bis 8

MATERIAL & METHODEN

min Elongation (abhängig von der Produktlänge); die Elongation erfolgte für Produkte < 3 kb bei 68°C bzw. für Produkte > 3 kb bei 72°C. In der zweiten Stufe wurden diese Bedingungen zwanzigmal wiederholt, allerdings wurde zur Steigerung der Produktmenge der Elongationsschritt pro Zyklus um 20 s erhöht. Am Ende folgte eine Elongation bei 72°C für 7 min, um die in vorausgehenden Zyklen nicht komplett synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen.

2.2.1.11.2. Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

Die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes/Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) wurde für Produkte von 5 bis 20 kb verwendet. Hier handelt es sich um eine modifizierte Pfu-Polymerase, welche aufgrund ihrer hohen Aktivität kurze Extensionszeiten von 15 bis 30 s/kb ermöglicht. Das Primerdesign und die Versuchsansätze wurden laut Herstellerprotokoll umgesetzt: 1 U Polymerase, 10 ng Template, je 25 pmol Primer.

2.2.1.12. DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse dient der Bestimmung der Primärstruktur in DNA-Molekülen. Das von Sanger entwickelte Verfahren nutzt radioaktiv markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs), nach deren Einbau in den DNA-Strang durch eine DNA-Polymerase eine weitere Elongation des Stranges durch Störung der Phosphodiesterbindung unmöglich wird (Sanger *et al.* 1977).

In dieser Arbeit wurden zur Markierung der ddNTPs statt radioaktiver Isotope Derivate des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin aus dem BigDye®-System von Applied Biosystems verwendet. Da jede Base mit einer anderen Farbe markiert war konnte die Reaktion für alle vier Basen in einem Reaktionsansatz erfolgen. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und in einem Mastercycler der Eppendorf AG (Hamburg) amplifiziert.

Reaktionsansatz:

| | |
|-------------|---------|
| Template | 500 ng |
| Primer | 10 pmol |
| BigDye-Mix | 2 µl |
| Aqua bidest | ad 5 µl |

CycleSequencing-Reaktion:

| | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|----------------------|------------|-------|------------|
| Denaturierung | 96°C | 15 s | 30 x |
| Annealing | 53°C | 15 s | |
| Elongation | 60°C | 4 min | |

MATERIAL & METHODEN

Die anschließende DNA-Präzipitation in Ethanol und NaO-Acetat sowie das Waschen der DNA-Pellets in Ethanol wurden von der Medigenomix GmbH (Martinsried) übernommen. Dort wurden auch die Annotationen an einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer von Applied Biosystems/Life Technologies™ GmbH (Darmstadt) vorgenommen.

Die Auswertung der Analyse erfolgte durch uns mittels der Software Sequence Navigator 1.0.1 von Applied Biosystems und Vector NTI® von Invitrogen/Life Technologies™ GmbH (Darmstadt).

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit bei den Sequenzanalysen eingesetzten Primer aufgelistet.

- Sequenzanalyse der DEST-Vektoren:

| Konstrukt | Primername | Primersequenz |
|--------------|---------------------|---------------------------------|
| N-Venus-DEST | N-hRluc seq fo -105 | 5'-CAAAATGTCGTAACAACCTCCGC-3' |
| C-Venus-DEST | C-YFP fo | 5'-CTCGTTCAGCTTTCTTGTACAAAGT-3' |
| | TK polyA re | 5'-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3' |
| N-hRluc-DEST | N-hRluc seq fo -105 | 5'-CAAAATGTCGTAACAACCTCCGC-3' |
| C-hRluc-DEST | C-hRluc seq fo -138 | 5'-CATAGTGACTGGATATGTTGTG-3' |
| | TK polyA re | 5'-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3' |

- Sequenzanalyse der *entry clones*:

| Primername | Primersequenz |
|-----------------|---------------------------|
| M13u: (forward) | 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3' |
| M13r: (reverse) | 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' |

- Sequenzanalyse der *expression clones*:

| Primername | Primersequenz |
|-------------|-----------------------------|
| EGFP-N-F | 5'-GGAGGTCTATATAAGCAGAGC-3' |
| T7 fo | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' |
| TK polyA re | 5'-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3' |

2.2.1.13. Site Directed Mutagenesis

Zur Einführung von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in Plasmide verwendeten wir das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene/Agilent Technologies (Maulbronn). Dieses System ermöglicht Modifikationen an superspiralisierter Doppelstrang-DNA (dsDNA) in lediglich vier Schritten: (1) Dazu werden zwei Primer erstellt, welche komplementär zu den beiden Doppelsträngen der Template-DNA sind und in der Mitte ihrer Sequenz die

MATERIAL & METHODEN

gewünschten Veränderungen enthalten. Dies geschieht von Hand den Vorgaben des Kit-Herstellers entsprechend oder mittels des Online Tools „QuikChange® Primer Design Program“ (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>). (2) Diese Oligonukleotid-Primer werden während des Temperature Cycling in einem PCR-Cycler durch eine PfuTurbo® DNA-Polymerase verlängert, was zur Bildung von einzelsträngigen Plasmid-Kopien mit den gewünschten Veränderungen führt.

Reaktionsansatz zur Amplifikation beider Plasmidstränge:

| | |
|--------------------------|----------|
| 10x Reaktionspuffer | 5 µl |
| Template-DNA | 5-50 ng |
| SDM forward Primer | 125 ng |
| SDM reverse Primer | 125 ng |
| dNTP mix | 20 nmol |
| H ₂ O bidest. | ad 50 µl |
| PfuTurbo® DNA-Polymerase | 2,5 U |

Thermal Cycling:

| | Zyklen | Temperatur | Dauer |
|--|---------------|------------|------------|
| 1x | Denaturierung | 95°C | 30 s |
| abhängig von der Art der Mutagenese: Punktmutationen: 12 Zyklen Einzelne Deletionen/Insertionen: 16 Zyklen Änderung mehrerer Aminosäuren: 18 Zyklen | Denaturierung | 95°C | 30 s |
| | Annealing | 55°C | 1 min |
| | Elongation | 68°C | 1 min/1 kb |

(3) Im Anschluss wird der Reaktionsansatz mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym DpnI (10 U) bei 37°C über 1 h verdaut, was zu einem Abbau des Templates führt und nur das nicht methylierte PCR-Produkt integer lässt. (4) Schließlich wird das Thermal Cycling-Produkt in XL1-Blue Supercompetent Cells transformiert. Dort werden die Einzelstrangbrüche an den Enden der PCR-Produkte geschlossen, der komplementäre Strang aufgefüllt und das mutagenisierte Plasmid repliziert.

2.2.1.14. Gateway® Cloning

Das Gateway® Cloning von Invitrogen/Life Technologies™ GmbH (Darmstadt) stellt eine Methode zur Klonierung von Nukleinsäuren basierend auf dem Rekombinations-Prinzip des Lambda-Bakteriophagen dar (Landy 1989). Dabei handelt es sich um eine zweistufige Reaktion, die lysogene BP- und die lytische LR-Reaktion, welche jeweils eine eigene Enzymausstattung besitzen (siehe 3.1.2). Für die präzise Auswahl der Rekombinationsschnittstellen spielen *attachment sites* (*att-sites*) eine große Rolle.

MATERIAL & METHODEN

2.2.1.14.1. Erstellung von *entry clones* (BP-Reaktion)

Entry clones dienen im Gateway®-System als Gen-Bibliotheken aus welchen mit geringem Aufwand Expressionskonstrukte erstellt werden können. Sie werden in der BP-Reaktion aus *attB*-flankierten PCR-Produkten und einem Donor-Vektor erstellt. Dazu werden zu 50 fmol *attB*-haltigem PCR-Produkt 150 ng Donor-Vektor pDONR™ gegeben. Die Menge des PCR-Produktes wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Menge [ng]} = \text{Ziel-Menge [fmol]} \times \text{Basenlänge} \times (660 \text{ fg / fmol}) \times (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

Die Reaktion wird in TE-Puffer (pH 8) ad 4 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 1 µl BP Clonase™ II Enzym Mix gestartet. Laut Herstellerangaben kann die Inkubation bei 25°C in einem PCR-Cycler über 1 bis 18 Stunden dauern; zur Steigerung der Effizienz dieser Reaktion ließen wir sie über Nacht ablaufen. Dann wurden die Reaktionsenzyme durch Zugabe von 1 µl Proteinase K bei 37°C über 10 min inaktiviert. Es folgte die Transformation von 1 µl des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH5α (siehe 2.2.1.3).

2.2.1.14.2. Erstellung von *expression clones* (LR-Reaktion)

Expression clones sind Expressionskonstrukte, welche im Rahmen dieser Arbeit in eukaryonten Zellen eingesetzt wurden. Sie werden im Gateway®-System in der LR-Reaktion aus *entry clones* und DEST-Vektoren erstellt. Dazu werden 50 bis 150 ng entry clone zu 150 ng DEST-Vektor gegeben. Nach Auffüllen ad 4 µl mit TE-Puffer (pH 8) wird 1 µl LR Clonase™ II Enzym Mix zugegeben. Es folgt die Inkubation bei 25°C über 1 bis 18 Stunden, wobei wir im Rahmen dieser Arbeit über Nacht inkubierten. Die Inaktivierung der Reaktionsenzyme mittels 1 µl Proteinase K wurde bei 37°C über 10 min angesetzt. Es folgte die Transformation von 1 µl des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH5α (siehe 2.2.1.3).

2.2.1.15. Klonierung mittels In-Fusion® PCR Cloning System

Das In-Fusion® PCR Cloning System von Clontech/Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ermöglicht die End-zu-End-Verbindung von PCR-Produkten mit einem linearisierten Vektor durch Verwendung einer DNA-Polymerase aus dem Pockenvirus mit 3'–5' Exonuklease-Aktivität. Für die In-Fusion®-Reaktion müssen mittels entsprechender PCR-Primer 15 bp lange Überhänge an das 3'- und das 5'-Ende des PCR-Produktes gekoppelt werden, welche homolog zu den endständigen 15 bp des linearisierten Vektors sind. Durch die Wahl dieser Überhänge und der Schnittstelle im Vektor wird der Ort der Insertion gewählt. Auch kann in Fällen, in welchen sich keine Restriktionsschnittstelle an der gewünschten Position im Vektor befindet dieser per PCR amplifiziert und linearisiert werden.

Werden Vektor und Insert zusammengegeben, modifiziert das In-Fusion®-Enzym mittels seiner

MATERIAL & METHODEN

3'–5' Exonuklease-Aktivität die doppelsträngigen Überhänge in Einzelstränge und verbindet Vektor und Insert über diese miteinander. Wichtig ist die Berechnung der jeweils einzusetzenden Menge von Vektor und Insert. Diese kann entsprechend den Angaben des Herstellers (In-Fusion Cloning Procedure for Gel-purified PCR Inserts) oder mit Hilfe eines Online-Werkzeuges (siehe www.clontech.com/support/tools.asp) bestimmt werden. Die Inkubation mit dem Dry-Down Mix (lyophilisiertes In-Fusion®-Enzym) läuft zunächst über 15 min bei 37°C, wobei hier die Exonuklease aktiv ist. Im Anschluss folgen Annealing und Extension der DNA-Einzelstränge über 15 min bei 50°C.

Nach Abschluss dieser Reaktion werden 2,5 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation in Fusion-Blue™ Competent Cells verwendet (siehe 2.2.1.3). In diesen Zellen werden die Bindungen zwischen den DNA-Strängen von Vektor und Insert kovalent geschlossen.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Allgemeine Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen vom Typ COS-7 verwendet (siehe 2.1.5). Es wurde grundsätzlich unter einer Arbeitsbank mit Laminarströmung gearbeitet, um eine sterile Arbeitsumgebung zu gewährleisten. Als Nährmedium wurde RPMI-Medium benutzt, zu welchem 10% FCS und ein antibakterieller sowie antimykotischer Zusatz gegeben wurden (siehe 2.1.6). Das Medium und der antiinfektiöse Zusatz wurden bei einer Temperatur von 4°C gelagert, das FCS wurde bei -20°C tiefgefroren. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen gezüchtet. Die Inkubation der COS-7-Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage erneuert.

2.2.2.2. Generationswechsel der Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte ein Generationswechsel der Zellen. Dazu wurden sie zunächst zweimal mit je 1 ml sterilem und 37°C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml einer 37°C warmen Trypsinlösung zugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 5 min wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert, ob sich die Zellen ausreichend vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. War dies erfolgt, wurden 8 ml Nährmedium zugegeben und die Zellen mit der Pipettierhilfe durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt; ansonsten wurden sie für weitere 5 min inkubiert. Schließlich wurden 2 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und die überschüssigen Zellen verworfen. Das Nährmedium wurde in den neuen Flaschen auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen wurden im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.3. Vorbereitung der Zellen für die Nukleofektion

In dieser Arbeit wurden für die Transfektion am Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System

MATERIAL & METHODEN

für die BRET-Messungen 200.000 Zellen pro 96-Well bzw. 19,2 Mio. Zellen für eine ganze 96-Well-Platte benötigt. Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen in μ -slides VI Collagen IV von ibidi GmbH (Martinsried) kultiviert. Dafür wurden 1 Mio. Zellen pro Ansatz verwendet; diese große Menge an Zellen wurde am Amaxa Nucleofector® II transfiziert. Auch für die Messung der BRET-Scans am Spektrophotometer wurde in dieser Weise vorgegangen.

Um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, wurden die trypsinisierten Zellen in Medium suspendiert und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zählung unter dem Lichtmikroskop wurde entsprechend folgender Formel ausgewertet:

$$\text{Zellzahl} / 4 \times 10.000 = [\text{Zellen/ml}]$$

2.2.2.4. Hochdurchsatz-Transfektion am Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System

Bei der Nukleofektion handelt es sich um eine Form der Elektroporation. Dabei wird die Zellmembran durch Spannungspulse für DNA permeabel gemacht, wobei die Zellmembran als Plattenkondensator und die Lipiddoppelschicht als Isolator fungieren; das Zytoplasma ist leitfähig. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung, deren Feldstärke mehrere kV/cm erzeugt, wird die Membran polarisiert. Erreicht die Transmembran-Spannung einen kritischen Wert von 0,4 bis 1 V, steigt die Leitfähigkeit durch lokale Zerstörung der Membranintegrität drastisch an. Hydrophobe Poren wandeln sich in relativ stabile hydrophile Poren von 0,5 bis 1 nm Durchmesser mit einer Lebensdauer von wenigen Sekunden bis einigen Minuten um. Während dieser Zeit diffundiert die DNA in die Zellen. Schließlich bricht die Membranspannung wegen des Ladungsausgleichs durch die Poren wieder zusammen und die Membran reorganisiert sich.

Die transiente Transfektion der COS-7-Zellen für die BRET-Messungen erfolgte am Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System. Dazu wurden die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zu 85% Konfluenz gezüchtet. Es wurden 200.000 Zellen pro Well geerntet (siehe 2.2.2.3) und mit der DNA in 20 μ l SE-Puffer (Amaxa) pro Well gemischt. Wir führten – außer bei der BRET-Positivkontrolle – jeweils transiente Transfektionen mit je zwei Plasmiden, Donor und Akzeptor (Doppeltransfektion), durch. Dabei verwendeten wir 0,8 μ g DNA pro Well (siehe 3.1.3.3). Jeder Ansatz wurde in drei Replikaten angefertigt.

Nach erfolgter Elektroporation mit dem Programm FP-100 (siehe 3.1.3.1) wurden die Transfektionsansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 80 μ l Phenolrot-freies RPMI pro Well zugegeben und nach Durchmischung der Zellsuspension wurden je 40 μ l pro Ansatz auf die 96-Well-Platten übertragen. Die anschließende Inkubation der Zellen zur Expression der Konstrukte verlief über 18-24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

MATERIAL & METHODEN

2.2.2.5. Transfektion am Amaxa Nucleofector® II

Die transiente Transfektion am Amaxa Nucleofector® II erfolgte für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop in μ -slides von ibidi. Das Funktionsprinzip dieses Gerätes ist identisch zu dem im 96-Well-Format, lediglich die Küvetten und somit das Transfektionsvolumen sind größer.

Zu 3 μ g DNA wurden 1 Mio. COS-7-Zellen in Amaxa-Puffer ad 100 μ l gegeben. Nach der Nukleofektion wurden 200 μ l RPMI-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden je 120 μ l der Zellsuspension auf Collagen IV-beschichtete μ -slides ausgesät und über Nacht inkubiert.

2.2.3. Fluoreszenzspektroskopische Methoden

2.2.3.1. Hochdurchsatz-Detektion des *in vivo*-BRET am LUMIstar OPTIMA

Der Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor wurde in dieser Arbeit am LUMIstar OPTIMA im Luziferase-Kanal bei 475 nm (30 nm FWHM) und im BRET-Kanal bei 535 nm (30 nm FWHM) detektiert. Dazu wurden transfizierte COS-7-Zellen über Nacht in 100 μ l Phenolrot-freiem RPMI mit 10% FCS und 1% antibiotisch-antimykotischem Zusatz inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 70 μ l des Mediums abpipettiert und durch automatisierte Injektion des Substrates ViviRen™ (Promega) in Phenolrot-freiem RPMI-Medium mit 10% FCS ersetzt; die Zielkonzentration des Substrates lag bei 60 μ M. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit dem lipophilen Substrat über 2 min, um dessen Diffusion in die Zellen, Aktivierung und die Verteilung an die Luziferase-Moleküle zu gewährleisten.

Die Messung der Signalintensitäten in beiden Kanälen erfolgte über 30 Sekunden pro Well. Für jeden Ansatz wurden Dreifachbestimmungen erstellt. Die Messdaten wurden als .csv-Dateien zur Auswertung exportiert.

2.2.3.2. Detektion des *in vivo*-BRET am Cary Eclipse Spektrophotometer (BRET-Scan)

Für den *in vivo* BRET-Scan am Cary Eclipse Spektrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn), welches gleichermaßen Fluoreszenz und Biolumineszenz detektieren kann, wurden 1 Mio. COS-7-Zellen pro Ansatz am Amaxa Nucleofector® II transfiziert (siehe 2.2.2.3) und über 18 bis 24 Stunden im Brutschrank in 6-well Platten kultiviert.

Die Zellen wurden am folgenden Tag mit Trypsin geerntet (siehe 2.2.2.2) und in 2 ml Phenolrot-freiem RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert. Nach Übertrag in eine 3 ml Quarz-Küvette mit Magnetrührfisch folgte die Zugabe von ViviRen™ in einer Ziel-Konzentration von 60 μ M. Nach 2-minütiger Inkubation wurden Spektrum Scans der einzelnen Ansätze gemessen. Die Detektion der Signale erfolgte im Intervall von 400 bis 600 nm in 2 nm-Abständen.

MATERIAL & METHODEN

2.2.3.3. BRET-Ratio

Seit der ersten Beschreibung des BRET wurde diese Methode fortwährend weiterentwickelt (Xu *et al.* 1999). In dieser Arbeit wurde BRET¹ verwendet, welches auf Rluc und YFP basiert und Coelenterazin als Substrat benötigt.

Wurde der Energietransfer bei der Erstbeschreibung durch Xu noch deskriptiv bzw. bildlich anhand von BRET-Scans dargestellt, so wurde bereits sehr bald darauf die BRET-Ratio als quantitatives Maß für den Energietransfer entwickelt. Formel (1) stellt die erste Version der BRET-Ratio dar (Angers *et al.* 2000). In Formel (2) ist eine durch mathematische Umformung vereinfachte Version von Formel (1) dargestellt (Ayoub *et al.* 2002).

$$(1) \text{ BRET-Ratio} = (535_{\text{Probe}} - 475_{\text{Probe}} \times cf) / 475_{\text{Probe}}$$
$$cf = 535_{\text{Kontrolle}} / 475_{\text{Kontrolle}}$$

$$(2) \text{ BRET-Ratio} = (535_{\text{Probe}} / 475_{\text{Probe}}) - (535_{\text{Kontrolle}} / 475_{\text{Kontrolle}})$$

535_{Probe} und 475_{Probe} stehen für die Emission bei 535 nm bzw. 475 nm in der gemessenen BRET-Probe, welche die zu untersuchende Proteinpaarung enthält.

Da es aufgrund des breiten Emissionsspektrums von Rluc auch im Falle einer negativen Interaktion zu einem messbaren Signal bei 535 nm und somit zu einer messbaren BRET-Ratio kommt, ist die Verwendung passender Negativkontrollen unerlässlich. Diese fließen nach Angers in dem Korrekturfaktor cf in die Berechnung der BRET-Ratio ein.

Als Negativkontrolle setzten wir für jeden im Experiment verwendeten Energiedonor Dreifachansätze an, die neben dem Donorprotein jeweils N-Venus-DEST bzw. C-Venus-DEST ohne Fusionspartner als potentiellen Akzeptor enthielten. Dies diente auch der Angleichung des Expressionsniveaus in Proben und Negativkontrollen. So konnten neben dem falsch positiven Signal im BRET-Kanal (535 nm) auch eventuelle zufällige Interaktionen des Donorproteins mit Venus aus der Berechnung der BRET-Ratio eliminiert werden.

535_{Kontrolle} und 475_{Kontrolle} stehen in beiden Formeln für die bei 535 nm bzw. 475 nm gemessene Emission der Negativkontrollen.

2.2.3.4. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die transfizierten Zellen 24 h nach der Transfektion in den ibidi µ-slides zweimal mit PBS (je 100 µl/Well) gewaschen, um FCS-Reste, deren Proteine die Immunfluoreszenzfärbung stören können, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min in 3,7% Formalin-haltigem RPMI-Medium bei 37°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte die Permeabilisierung der Zellmembranen in 120 µl 1% TritonX-100/PBS für 5 min.

MATERIAL & METHODEN

Nach diesem Schritt wurde fünfmal mit PBS gewaschen und der primäre Antikörper Anti-Katalase 1:100 in PBS verdünnt. Es wurden jeweils 30 µl der Antikörperverdünnung in die Kammern der µ-slides pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Durch 15-maliges waschen mit 100 µl PBS pro Well wurde der nicht gebundene primäre Antikörper aus den Wells entfernt. Der in PBS 1:50 verdünnte sekundäre Antikörper wurde zu den Zellen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dabei war es wichtig, den TRITC-markierten Antikörper vor Lichteinfall zu schützen, um seine maximale Fluoreszenzintensität zu erhalten. Nach 15-maligem Waschen mit PBS wurden jeweils 30 µl des anti-fading Reagens Vectashield Mounting Medium for Fluorescence H-1000 in die Kammern der µ-slides gegeben.

2.2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am inversen Mikroskop Zeiss Axiovert 135 mit entsprechenden Immunfluoreszenzfiltern vorgenommen (siehe 2.1.17). Bei TRITC liegt das Maximum der Exzitation bei 552 nm, das Maximum der Emission bei 570 nm. Das Exzitationsmaximum für Venus liegt bei 514 nm, allerdings hat es einen sehr flachen Verlauf und ein zweites Maximum bei 485 nm; die Emission von Venus erreicht ihr Maximum bei 527 nm.

Zur Dokumentation der Fluoreszenzmikroskopie wurden eine Digitalkamera der Firma Zeiss sowie die Software Zeiss Axiovision verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung einer neuen Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine BRET-basierte Hochdurchsatz-Methode (iBRET) zur *in vivo*-Untersuchung von PPI etabliert. Für die Verwirklichung eines Hochdurchsatzverfahrens war die Anwendung geeigneter Verfahren in den einzelnen Schritten des Prozesses von zentraler Bedeutung. Durch Verwendung des Substrates ViviRenTM Live Cell Substrate (Promega) wurden *in vivo*-Messungen gewährleistet. Dieses Substrat kann nur in lebenden eukaryonten Zellen durch Spaltung einer Esterbindung zur aktiven Form Coelenterazin aktiviert werden. Auch mussten bei der Klonierung von Fusionskonstrukten, bei der Transfektion der Zellen sowie der Signal-Detektion automatisierbare Verfahren gewählt werden: dies wurde durch Einsatz des Gateway[®]-Systems (Invitrogen) bei der Klonierung, des AmaxaTM NucleofectorTM 96-well ShuttleTM Systems bei der Transfektion und des BMG LUMIstar Optima bei der Detektion erreicht. Zur Beschleunigung der Auswertung wurde eine bioinformatische Methode zur Berechnung von Schwellenwerten für positive Interaktionen entwickelt.

3.1.1. Erstellung der *destination vectors* (DEST-Vektoren) für das Gateway[®]-System

Für die Untersuchung von PPI im Hochdurchsatzverfahren verwendeten wir das Vektorsystem Gateway[®] von Invitrogen. Dieses basiert auf dem Replikationsapparat der Lambda-Bakteriophagen und ermöglicht einen schnellen Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren bzw. Plasmide ohne Verwendung von Restriktionsenzymen (Landy 1989).

Für die Verwendung in iBRET sind Expressionskonstrukte mit den beiden Reporterproteinen Rluc (Energiedonor) und YFP (Energieakzeptor) erforderlich. Zur Optimierung der Signalintensitäten dieser beiden Proteine verwendeten wir Rluc mit humanisiertem *codon usage* (hRluc) und modifizierten YFP zu Venus.

Die Gateway[®] DEST-Vektoren VividColors pcDNATM6.2/N-YFP-DEST und VividColors pcDNATM6.2/C-YFP-DEST mit YFP N- bzw. C-terminal der *att-site*-flankierten Replikationsbereiche waren bei Invitrogen kommerziell verfügbar. In diese wurden die veränderten Reporter hRluc und Venus mit Orientierung N- sowie C-terminal der *att-site*-flankierten Bereiche kloniert.

3.1.1.1. Verwendung von Rluc mit humanisiertem Codongebrauch (hRluc)

Der Einsatz von Rluc mit humanisiertem *codon usage* (hRluc) führt in eukaryonten Zellsystemen zu höheren Signalen der Luziferase-Aktivität. Grundlage dafür ist die Anpassung der cDNA-

ERGEBNISSE

Sequenz an das tRNA-Profil der Zellen. Dies führt zu einer verbesserten Expression des Proteins und einer konsekutiven Zunahme der Luziferase-Aktivität.

In dem in Abbildung 9 dargestellten Beispiel ist die Luziferase-Aktivität von hRluc um den Faktor 3,3 höher gegenüber Rluc. Die Expression erfolgte in beiden Fällen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

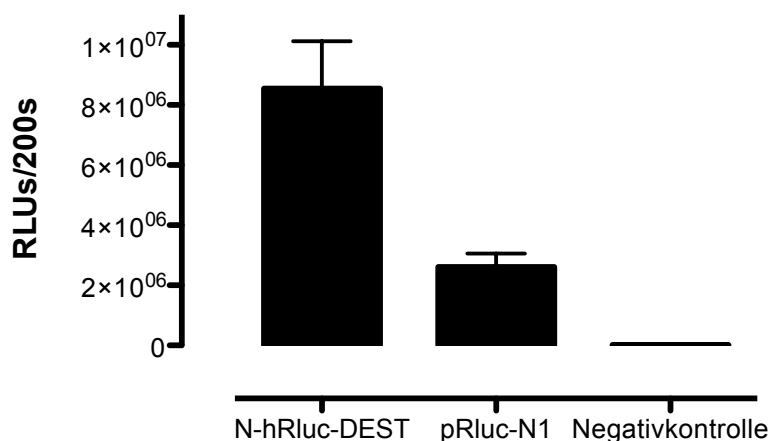


Abbildung 9: Vergleich der Signalintensitäten von hRluc und Rluc

COS-7-Zellen wurden mit den Konstrukten N-hRluc-DEST und pRluc-N1 transfiziert; in der Negativkontrolle wurden die Zellen ohne DNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Substrat ViviRen™ zu den Zellen gegeben und die Luziferase-Aktivität gemessen. RLU = *Relative light units*.

3.1.1.1.1. Erstellung von N-hRluc-DEST

Das Reporterprotein hRluc wurde mittels Expand High Fidelity PCR System (Roche) und der Primer hRluc *SacI* for und hRluc *CclI* rev aus dem Vektor phRG-TK (Promega) amplifiziert. Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen für *SacI* am 5'-Ende und *CclI* (*XhoI*) am 3'-Ende des PCR-Produktes eingeführt.

| | |
|-----------------------|--------------------------|
| hRluc <i>SacI</i> for | GCTGAGCTCTCCGGTACTGTTGG |
| hRluc <i>CclI</i> rev | ACTCTCGAGCCCTGCTCGTTCTTC |

Das PCR-Produkt wurde an den beiden Restriktionsschnittstellen in den Vektor VividColors pcDNA™6.2/N-YFP-DEST per Ligation für *sticky ends* kloniert. In Abbildung 2 ist die Vektorkarte von N-hRluc-DEST dargestellt.

ERGEBNISSE

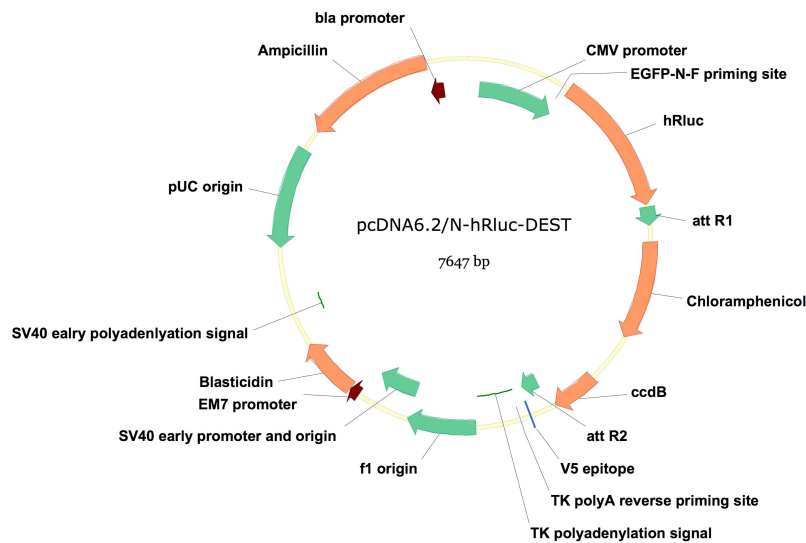


Abbildung 10: Vektorkarte von N-hRluc-DEST

3.1.1.1.2. Erstellung von C-hRluc-DEST

hRluc wurde mittels Expand High Fidelity PCR System (Roche) und der Primer hRluc *HpaI* for und hRluc *PmeI* rev aus dem Vektor phRG-TK (Promega) amplifiziert. Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen für *HpaI* am 5'-Ende und für *PmeI* am 3'-Ende des PCR-Produktes eingeführt.

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| hRluc <i>HpaI</i> for | GTAAAGTTAACATGGCTTCCAAGGTG |
| hRluc <i>PmeI</i> rev | GACGTTTAAACTTACTGCTCGTTCTTC |

Es erfolgte die Klonierung des PCR-Produktes in pcDNATM6.2/C-YFP-DEST mit den Restriktionsenzymen *HpaI* und *PmeI* und einer Ligrationsreaktion für *blunt ends*. In Abbildung 3 ist die Vektorkarte von C-hRluc-DEST dargestellt.

ERGEBNISSE

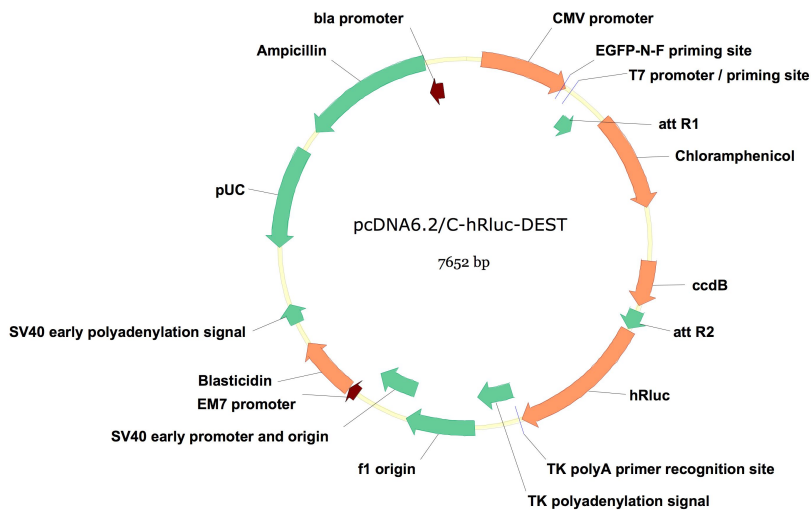


Abbildung 11: Vektorkarte von C-hRluc-DEST

3.1.1.2. Mutagenisierung von EYFP zu Venus

Die Reifung von YFP durch Proteinfaltung erfolgt temperaturabhängig mit einem Optimum bei 30°C. Da diese aber durch Azidose und Chlorid-Ionen empfindlich gestört werden kann, läuft sie in manchen Zellorganellen auch bei dieser Temperatur nicht optimal ab und die Fluoreszenz-Eigenschaften sind gestört (Nagai *et al.* 2002). Eine verbesserte Form von YFP stellt EYFP dar, das durch die beiden Mutationen V68L und R79K eine höhere Quantenausbeute besitzt. Venus stellt wiederum eine stabilere Variante dieses Proteins dar und zeichnet sich gegenüber EYFP aufgrund der Mutation F46L durch eine schnellere Reifung aus. Durch die Mutationen F64L, M153T, V163A und S175G weist es eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Protonen und Chlorid-Ionen auf. Die Signalintensität von Venus gegenüber YFP wurde von Nagai als 30fach höher beschrieben.

Wir führten im Vektor pEYFP-N1 (Clontech) per QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers die fünf Punktmutationen F46L, F64L, M153T, V163A und S175G in EYFP ein und erhielten hierdurch den Vektor pVenus-N1, dessen Vektorkarte in Abbildung 4 dargestellt ist.

ERGEBNISSE

Folgende Primerpaare wurden für die Mutagenese verwendet:

| | |
|-----------------|--|
| F47L sense | CAAGCTGACCCTGAAGTT <u>A</u> ATCTGCACCACCGG |
| F47L antisense | CCGGTGGTGCAGAT <u>T</u> AACTTCAGGGTCAGCTTG |
| F65L sense | CCTCGTGACCACCTT <u>A</u> GGCTACGGCCT |
| F65L antisense | AGGCCGTAGCC <u>T</u> AAGGTGGTCACGAGG |
| M154T sense | ACAGCCACAACGTCTATATCA <u>C</u> GGCCGACAAGC |
| M154T antisense | GCTTGTCGGCC <u>G</u> TGATATAGACGTTGTGGCTGT |
| V164A sense | GAAGAACGGCATCAAGG <u>C</u> GAACTTCAAGATCCGCC |
| V164A antisense | GGCGGATCTTGAAGTTC <u>G</u> CCTTGATGCCGTTCTTC |
| S176G sense | ATCGAGGACGGC <u>G</u> GCGTGCAGCTCG |
| S176G antisense | CGAGCTGCACGC <u>C</u> GCCGTCCTCGAT |

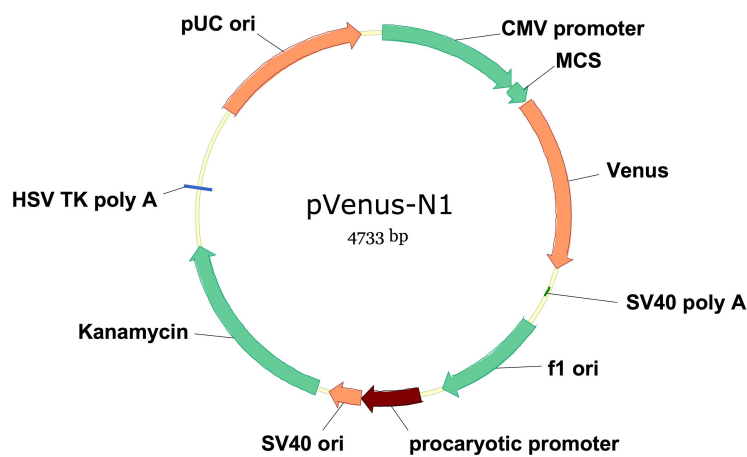


Abbildung 12: Vektorkarte von pVenus-N1

Venus zeigte im Vergleich zu EYFP fluoreszenzmikroskopisch eine deutlich höhere Signalintensität (Abbildung 13). Das Fluoreszenzmuster ist bei beiden Proteinen im Zytoplasma sowie im Zellkern lokalisiert.

ERGEBNISSE

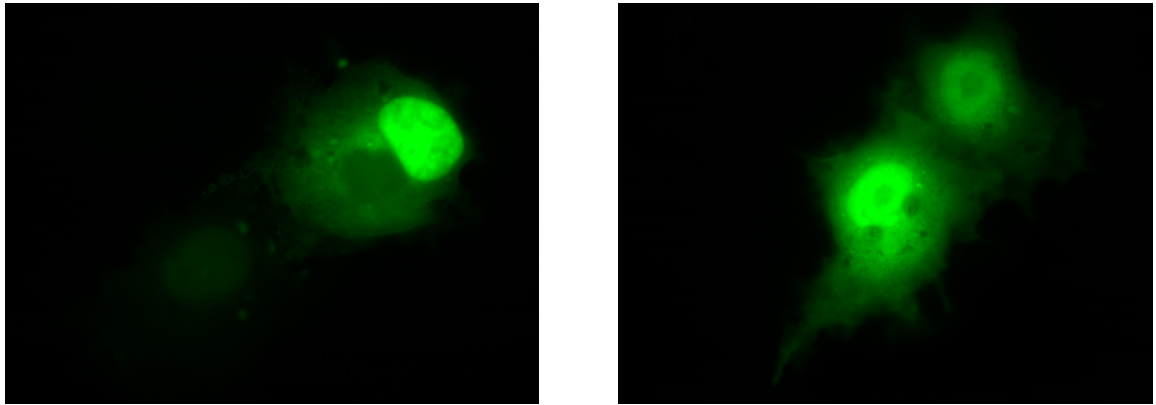


Abbildung 13: Expression von pEYFP-N1 (links) und pVenus-N1 (rechts) in COS-7-Zellen
COS-7-Zellen wurden mit pEYFP-N1 und pVenus-N1 per Nukleofektion transfiziert und nach 24 Stunden *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.1.1.2.1. Erstellung von N-Venus-DEST

Venus wurde mittels Expand High Fidelity PCR System (Roche) und der Primer Venus fo und *CcrI* Venus re aus dem Vektor pVenus-N1 amplifiziert. Dabei wurde die Restriktionsschnittstelle *CcrI* (*XhoI*) am 3'-Ende des PCR-Produktes eingeführt.

| | |
|----------------------|--------------------------|
| Venus fo | CTAGCGCTACCGGACTCAGATCTC |
| <i>CcrI</i> Venus re | CGGCTCGAGTACTTGTACAGCTCG |

Das PCR-Fragment wurde dann an die Stelle von YFP in den Vektor pcDNATM6.2/N-YFP-DEST mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *CcrI* und einer Ligationsreaktion für *sticky ends* kloniert und wir erhielten N-Venus-DEST (Abbildung 6).

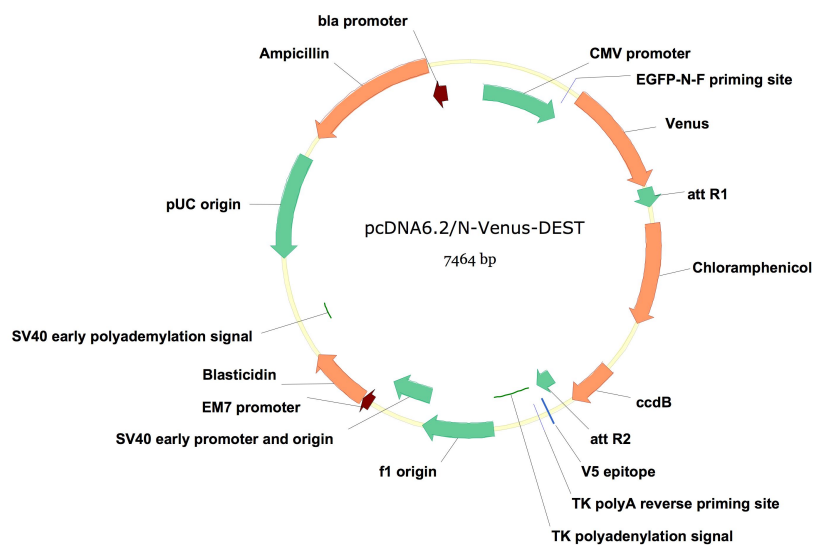


Abbildung 14: Vektorkarte von N-Venus-DEST

ERGEBNISSE

3.1.1.2.2. Erstellung von C-Venus-DEST

Venus wurde mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) aus pVenus-N1 amplifiziert, dabei wurden mittels der Primer *HpaI* Venus fo und *PmeI* Venus re die Restriktionsschnittstellen *HpaI* am 5'-Ende und *PmeI* am 3'-Ende des PCR-Produktes eingeführt.

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| <i>HpaI</i> Venus fo | GTCGTTAA C ATGGTGAGCAAGGGC |
| <i>PmeI</i> Venus re | TCTAGTTTAAACGCCGCTTTACTTGTACAG |

Das PCR-Produkt wurde nach Restriktionsverdau mit *HpaI* und *PmeI* und einer Ligationsreaktion für *blunt ends* in den Vektor pcDNATM6.2/C-YFP-DEST kloniert. Das Produkt der Reaktion war C-Venus-DEST (Abbildung 7).

Die Integrität aller vier DEST-Vektoren wurde anhand von Sequenzanalysen im Bereich der durchgeführten Modifikationen verifiziert.

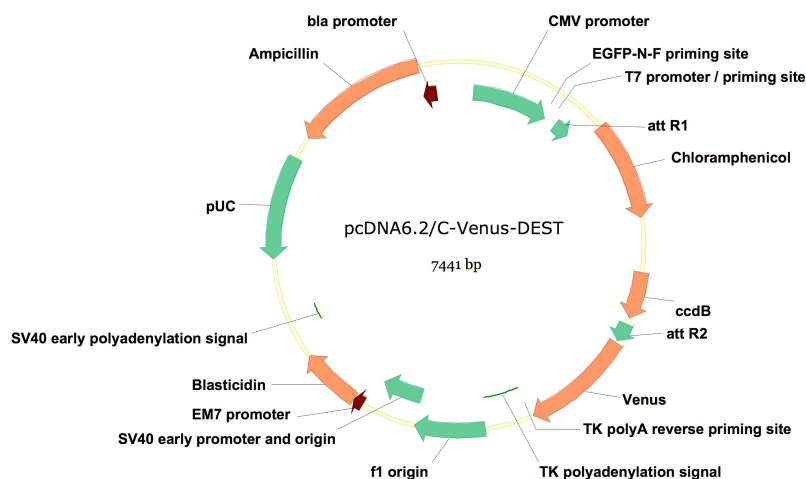


Abbildung 15: Vektorkarte von C-Venus-DEST

3.1.2. Rapid cloning: Erstellung von Gateway®-Konstrukten

Das Gateway®-System ist ein Hochdurchsatz-fähiges Verfahren zur Klonierung von Nukleinsäuren in Vektoren basierend auf dem Rekombinations-Prinzip des Lambda-Bakteriophagen (Landy 1989). Es ermöglicht aufgrund seiner enzymatischen Ausstattung (Tabelle 1) und der beteiligten *att-sites* (Tabelle 2) den exakten Einbau eines cDNA-Fragmentes an die dafür vorgesehene Position (*site specific*).

ERGEBNISSE

| Reaktionsschritt | Beteiligte Enzyme |
|------------------|---|
| BP-Reaktion | Bakteriophage λ Integrase (Int) <i>E. coli</i> integration host factor (IHF) |
| LR-Reaktion | Bakteriophage λ Integrase und Excisionase (Xis) <i>E. coli</i> integration host factor (IHF) |

Tabelle 1: Enzymausstattung des Gateway®-Systems

| att-site | Größe | Lokalisation |
|----------|--------|--------------------------------------|
| attB | 25 bp | PCR-Produkt, <i>expression clone</i> |
| attP | 200 bp | <i>donor vector</i> |
| attL | 100 bp | <i>entry clone</i> |
| attR | 125 bp | <i>destination vector</i> |

Tabelle 2: att-sites im Gateway®-System

bp = Basenpaare

Das Vorgehen zum Erstellen von Expressionsvektoren erfordert eine zweistufige Reaktion bestehend aus der lysogenen BP- und der lytischen LR-Reaktion, benannt nach den jeweils initial beteiligten *att*-sites. Im ersten Schritt, der BP-Reaktion (Abbildung 16), werden *attB*-flankierte PCR-Produkte, welche die cDNA des zu untersuchenden Proteins enthalten, in einen *donor vector* rekombiniert. Dabei entsteht ein *entry clone*. In der LR-Reaktion (Abbildung 17) wird die cDNA aus dem *entry clone* an einen DEST-Vektor übergeben, wodurch Expressionskonstrukte entstehen. Diese Plasmide können je nach Ausstattung in verschiedenen Zellsystemen exprimiert werden.

BP - Reaktion (lysogen)

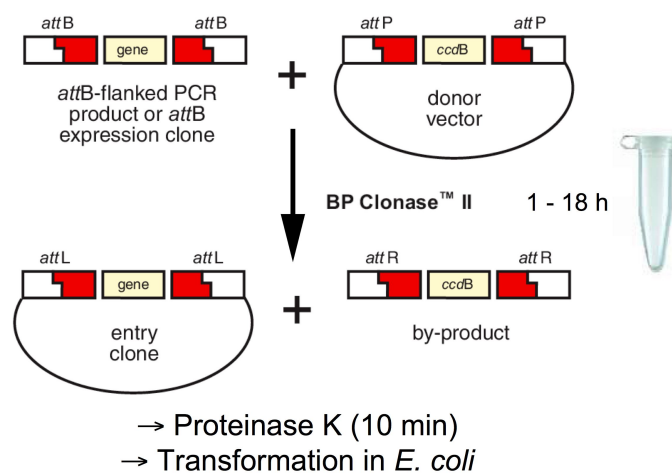


Abbildung 16: BP-Reaktion

(Abbildung nach Herstellervorlage erstellt)

ERGEBNISSE

LR - Reaktion (lytisch)

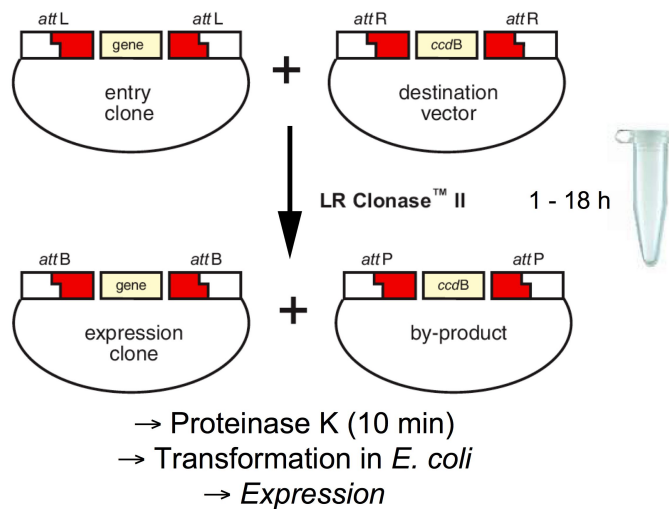


Abbildung 17: LR-Reaktion

(Abbildung nach Herstellervorlage erstellt)

3.1.2.1. Erstellung att-site-flankierter PCR-Produkte

Es wurden per PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) oder der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) att-site-flankierte cDNA-Doppelstränge aller für diese Arbeit relevanten Konstrukte erstellt. Die Primer enthielten am 5'-Ende 4 Guanin-Reste und daneben auch die 25 Basen langen attB1- und attB2-Sequenzen. Bei Fusionskonstrukten mit einem N-terminal gelegenen Reporterprotein wurde das START-Codon des untersuchten Gens entfernt, um einen alternativen Startpunkt für die Transkription der mRNA zu verhindern. Im Folgenden werden diese Produkte als „STOP“ bezeichnet, da sie am 3'-Ende ein STOP-Codon enthalten. Bei Fusionskonstrukten mit C-terminal gelegenen Reporter wurde – sofern vorhanden – das STOP-Codon in der cDNA-Sequenz entfernt. Diese Produkte werden im Folgenden als „ΔSTOP“ bezeichnet.

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Prüfung der Produktlänge mittels Agarose-Gelelektrophorese. Sofern das PCR-Produkt die erwartete Länge hatte und keine unspezifischen Produkte im Gel zu sehen waren, erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Gelelution und deren Quantifizierung für die BP-Reaktion.

Nachfolgend werden die jeweils verwendeten Primerpaare aufgelistet:

- BRET-Positivkontrollen:

Für die Validierung der Methode und als BRET-Positivkontrolle in jedem Experiment erstellten wir Fusionsproteine aus hRluc und Venus. Dazu generierten wir hRluc-PCR-Produkte, welche wir in N- und C-Venus-DEST klonierten.

ERGEBNISSE

| | |
|---------------------------|--|
| C- <i>attB1</i> -hRluc-fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTTCCAAGGTGTAC |
| C- <i>attB2</i> -hRluc-re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATACTGCTCGTTCTTCAGCAC |
| N- <i>attB1</i> -hRluc-fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTTCCAAGGTGTACGAC |
| N- <i>attB2</i> -hRluc-re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACTGCTCGTTCTTCAGCAC |

- ABCD1 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|-----------------------|--|
| ALD <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGACATGCCGGTGCTCTCCAGG |
| N-ALD <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAATTCAGGTGGAGGCACC |
| C-ALD <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAATTCGGGTGGAGGCACC |

- ADRB2 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|---------------------------------|--|
| ADRB2 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGCAACCCGGG |
| ADRB2 <i>attB2</i> re STOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACAGCAGTGAGTCATTTGTACTAC |
| ADRB2 <i>attB2</i> re deltaSTOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCCCAGCAGTGAGTCATTTGTACTAC |

- PEX3 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|------------------------|--|
| PEX3 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAAGATGCTGAGGTCTGTATGG |
| N-PEX3 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGATCATTTCTCCAGTTGC |
| C-PEX3 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGATCTTTTCTCCAGTTGC |

- PEX19 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|-------------------------|---|
| PEX19 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAGATGGCCGCCGCTGAGGAAGG |
| N-PEX19 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCTTCACATGATCAGACACGTGTTT |
| C-PEX19 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCTTCCCATGATCAGACACGTGTTT |

ERGEBNISSE

- PEX26 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|------------------------------------|---|
| PEX26 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGAAGAGCGATTCTTCG ACCTCTGCAGCC |
| PEX26 <i>attB2</i> re STOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTCACGGATGCGGAG CTGGTAGAGGCG |
| PEX26 <i>attB2</i> re deltaSTOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCGGTCACGGATGCGGAG CTGGTAGAGGCG |

- PEX26 1-251 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|--|---|
| PEX26 251 <i>attB2</i> re STOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGGGCAGAGAAAAGAA GTGGCTCAC |
| PEX26 251 <i>attB2</i> re deltaSTOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGGCAGAGAAAAGAAGT GGCTCAC |

- PEX26 1-269 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|---------------------------------------|---|
| PEX26 1-269 <i>attB2</i> STOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTAAAATCTCACCACCAG GAGACAGAG |
| PEX26 1-269 <i>attB2</i> deltaSTOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAATCTCACCACCAGGAG ACAGAG |

- PEX26 29-174 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|---------------------------------------|--|
| PEX26 29-174 +ATG <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGTTATGCCGGCCCGGG CGCCGGCC |
| PEX26 29-174 +stop <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATAAGCAGCCCAGAGG CAGCAGCACC |
| PEX26 29-174 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTTCCGGCCCGGGCGC CGGCC |
| PEX26 29-174 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATAAGCAGCCCAGAGGCA GCAGCACCCGC |

- PEX26 175-305 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|--|---|
| PEX26 175-305 +ATG <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGTTATGTCGGAGGCTGA GGAGCTAGTGG |
| PEX26 175-305 +stop <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGTCACGGATGCGGA GCTG |
| PEX26 175-305 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTTTCGGAGGCTGAGGA GCTAGTGGTG |

ERGEBNISSE

| | |
|----------------------------------|--|
| PEX26 175-305 <i>attB2</i> re | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTCACGGATGCGGAGCT G |
|----------------------------------|--|

- PEX26 175-251 (STOP/ Δ STOP):

| | |
|--|---|
| PEX26 175-305 +ATG <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGTTATGTCGGAGGCTGA GGAGCTAGTGG |
| PEX26 251 <i>attB2</i> re deltaSTOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGGCAGAGAAAAGAAGT GGCTCAC |
| PEX26 175-305 <i>attB1</i> fo | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTTTCGGAGGCTGAGGA GCTAGTGGTG |
| PEX26 251 <i>attB2</i> re STOP | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGGGCAGAGAAAAGAA GTGGCTCAC |

3.1.2.2. Erstellung von entry clones (BP-Reaktion)

Um eine Genbank zu erstellen, wurden die oben genannten *att-site*-flankierten PCR-Produkte in der BP-Reaktion entsprechend den Gateway®-Herstellerangaben in den Vektor pDONR™ rekombiniert und so erhielten wir von jedem *gene of interest* einen *entry clone* für N- bzw. C-terminales *tagging*.

3.1.2.3. Erstellung von expression clones (LR-Reaktion)

In der LR-Reaktion wurden die Gene aus den *entry clones* entsprechend den Gateway®-Herstellerangaben zur Erstellung der *expression clones* in die vier DEST-Vektoren des BRET-Systems rekombiniert.

3.1.3. Transiente Hochdurchsatz-Transfektion in eukaryonte Zellen mittels Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System (Nukleofektion)

Bei der Untersuchung der Interaktion zweier Proteine messen wir im iBRET-System acht mögliche Kombinationen dieser beiden Interaktionspartner hinsichtlich der Orientierung der Reporterproteine hRluc und Venus zu den beiden Proteinen (3.1.7). Hinzu kommen vier Negativkontrollen pro Interaktionspaar, welche zur Berechnung der BRET-Ratio unerlässlich sind. In jedem Ansatz werden zwei Plasmide (Donor und Akzeptor) in die Zellen transfiziert und jede Messung erfolgt als Dreifachbestimmung. Um diese große Zahl von Ansätzen mit einem angemessenen Aufwand zu untersuchen wird ein automatisierbares System zur transienten Transfektion eukaryonter Zellen benötigt. Dies wird vom auf Elektroporation basierenden 96-Well Shuttle™ System des Herstellers Lonza gewährleistet. Dieses System arbeitet mit Stromimpulsen

ERGEBNISSE

unterschiedlicher Intensität, Dauer und Konfiguration, welche sequenziell an Küvetten im 96-Well-Format abgegeben werden (siehe 2.2.2.4).

3.1.3.1. Optimierung der Programmwahl

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde das 96-Well Shuttle™ System auf unsere COS-7-Zelllinie optimiert. Dazu erfolgte – wie vom Hersteller empfohlen – zunächst die Transfektion von 200.000 Zellen pro Well. Die DNA-Menge wurde zwischen 0,2 und 1 µg pro Well variiert. Es wurden zwei Puffer gegeneinander getestet, der vom Hersteller gelieferte SE-Puffer und ein von uns hergestellter Puffer. Detektiert wurde die Luziferaseaktivität in einem Plattenlesegerät und am Mikroskop wurde die Viabilität der Zellen beurteilt.

Es zeigte sich, dass nur Puffer SE akzeptable Resultate in Bezug auf die Transfektionseffizienz erbrachte (Daten für eigenen Puffer nicht gezeigt). Zudem wurden mit dem Programm FP-100 die höchsten Signalintensitäten erzielt (Abbildung 18). Die Viabilität der Zellen war bei 0,8 µg DNA pro Well gut.

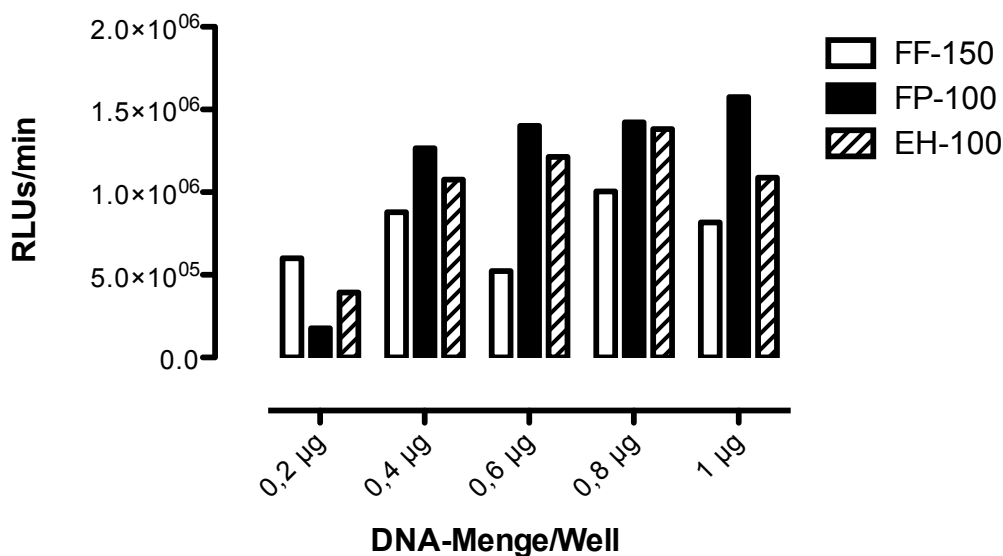


Abbildung 18: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von Nukleofektionsprogramm und DNA-Menge

Dargestellt sind im 96-Well Shuttle™ System durchgeführte Versuche zur Ermittlung des für COS-7-Zellen besten Nukleofektionsprogramms (FF-150, FP-100, EH-100) und der optimalen DNA-Menge pro Well (0,2-1 µg) anhand der Luziferaseaktivität.

3.1.3.2. Optimierung der Zellzahl

Um die optimale Zellzahl zu bestimmen, welche bei der Nukleofektion eingesetzt und danach inkubiert werden sollte, wurden 100.000 bis 400.000 Zellen pro Well mit 0,8 µg DNA pro Well in einem Volumen von 20 µl pro Well (in SE-Puffer) transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte die Zugabe von 80 µl RPMI, dann wurden 20 bis 80 µl Zellsuspension auf die Kulturplatte überführt.

ERGEBNISSE

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen hinsichtlich Konfluenz und Transfektionseffizienz (Luziferaseaktivität) beurteilt.

Es zeigten sich bei Transfektion von 200.000 Zellen pro Well und Übertrag von 40 µl Zellsuspension (80.000 Zellen) auf die Kulturplatte optimale Ergebnisse hinsichtlich Konfluenz und Luziferaseaktivität (Abbildung 19).

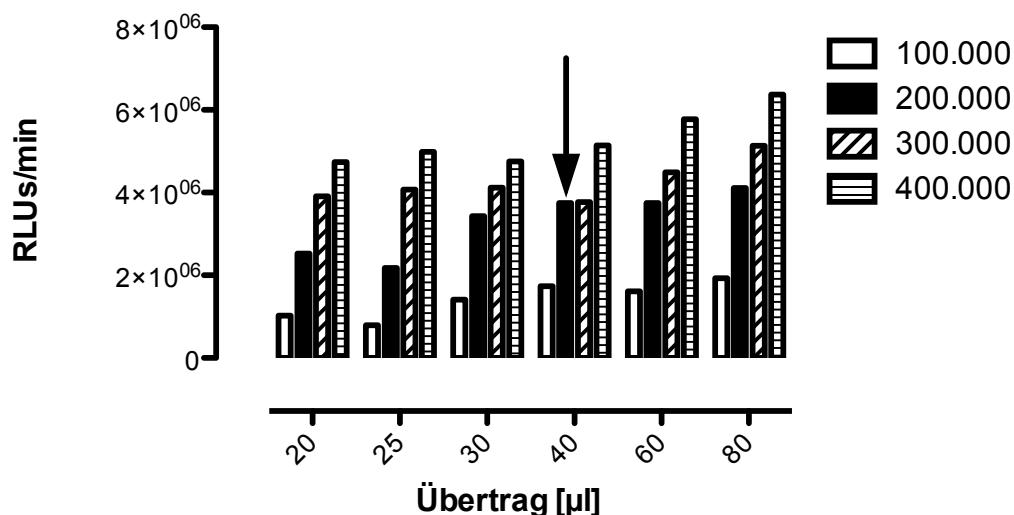


Abbildung 19: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von transfizierter Zellzahl und Übertrag zur Kultivierung

Dargestellt ist die Luziferaseaktivität von im 96-Well Shuttle™ System transfizierten COS-7-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl bei der Transfektion (100.000-400.000) und dem Volumen des Übertrags auf die 96-Well Kulturplatten (20-80 µl).

3.1.3.3. Optimierung der DNA-Konzentration

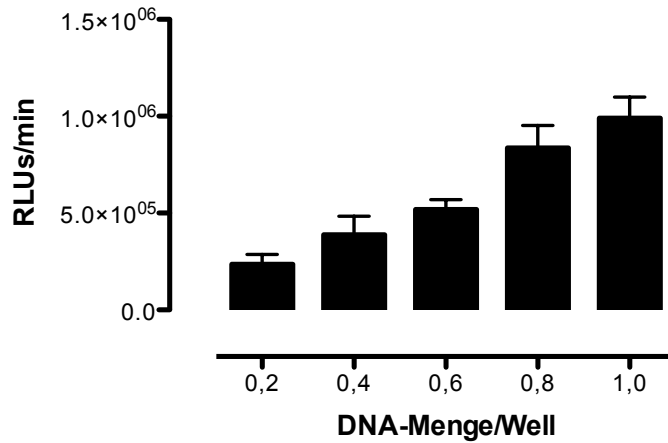
Zur Evaluierung der optimalen DNA-Konzentration bei der Nukleofektion wurden 200.000 Zellen pro Well transfiziert und 40 µl der Zellsuspension pro Well auf die Kulturplatten übertragen. Es wurden Konzentrationen von 0,2 bis 1,0 µg DNA pro Well eingesetzt. Die Transfektion erfolgte in vier Ansätzen, wobei in zwei Fällen eine einzelne DNA-Entität (Venus-hRluc bzw. hRlucSTOPSTOP-YFP) eingesetzt wurde und in zwei weiteren Fällen eine Co-Transfektion von zwei Plasmiden (hRluc-PAH & N-Venus-DEST bzw. hRluc-PAH & Venus-PAH) erfolgte.

Bei der PAH (Phenylalanin-Hydroxylase) handelt es sich um das Enzym, welches Phenylalanin in Tyrosin hydroxyliert. Dieses bildet über den Zwischenschritt der Dimerisierung Homotetramere und ist bei mutationsbedingten Defekten für die meisten Formen der Hyperphenylalaninämie und der Phenylketonurie verantwortlich. Diese Störungen können v.a. zu schwerer geistiger Retardierung führen. Sie werden jedoch in Deutschland seit den 1960er Jahren durch das Neugeborenencreening erfasst und sind in der Regel gut diätetisch und medikamentös behandelbar.

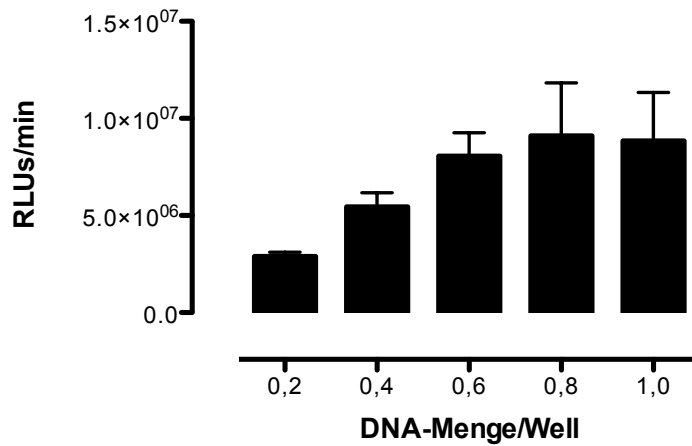
Es zeigte sich bei 0,8 µg DNA pro Well eine hohe Transfektionseffizienz mit hohen Luziferasesignalen bei guter Viabilität der Zellen (Abbildung 20).

ERGEBNISSE

A



B



C

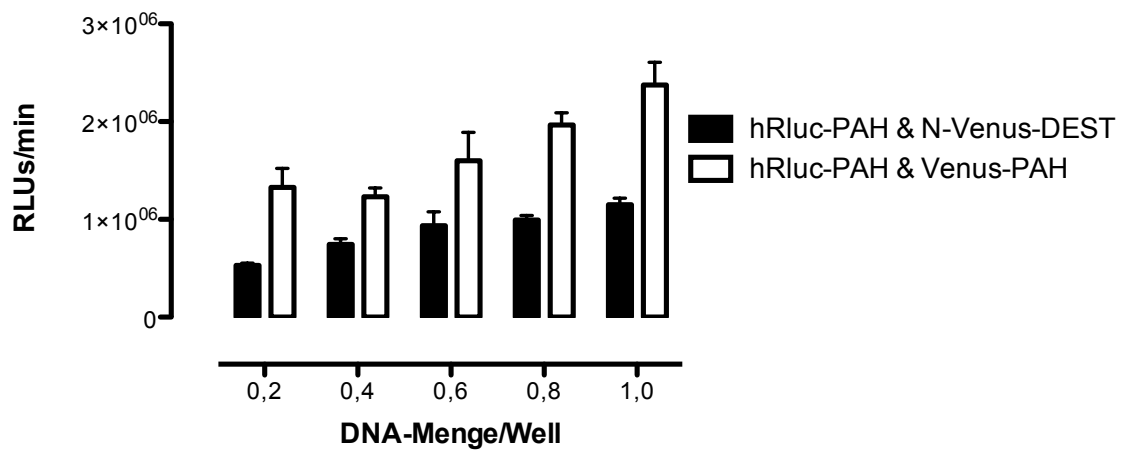


Abbildung 20: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration

Dargestellt sind Einzeltransfektionen mit den Plasmiden Venus-hRluc (A) und hRlucSTOPSTOP-YFP (B) sowie Co-Transfektionen von hRluc-PAH & N-Venus-DEST bzw. hRluc-PAH & Venus-PAH (C).

ERGEBNISSE

3.1.4. Hochdurchsatz-Detektion am LUMIstar OPTIMA (BMG Labtech)

Für die automatisierte Messung des Energietransfers verwendeten wir das Multiwell Platten-Lesegerät LUMIstar OPTIMA von BMG Labtech. Dieses Gerät kann zur Injektion des Substrates programmiert werden und ermöglicht in der *dual emission*-Funktion ein zeitgleiches Auslesen im Luziferase- und im BRET-Kanal. Das Plattenlesegerät besitzt einen für Lumineszenz-Messungen hoch sensitiven PMT-Detektor (*photomultiplier tubes*). Die gleichzeitige Aufzeichnung in den beiden Kanälen erfolgt mittels folgender Filter:

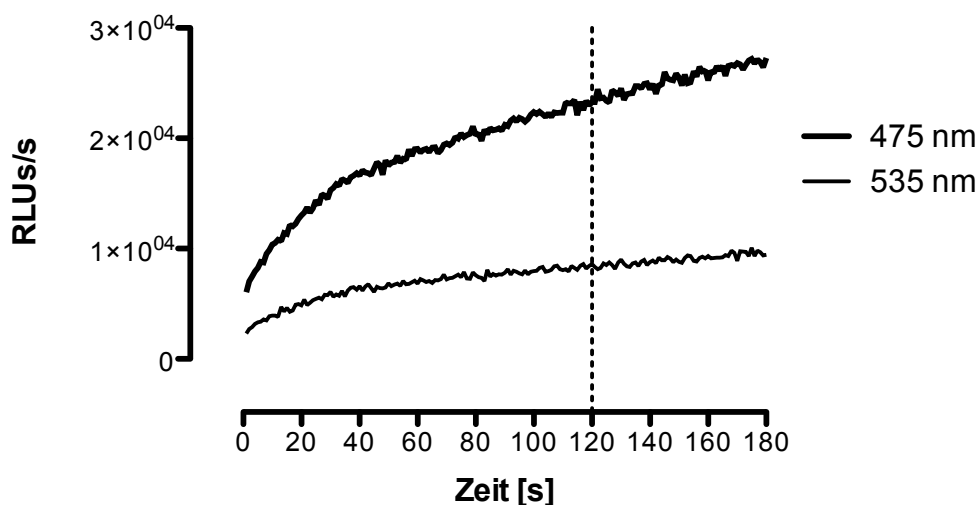
- Luziferase-Kanal: 475 nm (30 nm FWHM)
- BRET-Kanal: 535 nm (30 nm FWHM)

Die Ausgabe der Messdaten erfolgt in .csv-Dateien, aus welchen die Daten vergleichsweise einfach exportiert und ausgewertet werden können.

Zur Optimierung des Detektionsprozesses führten wir Messungen entsprechend den Vorgaben des Substrat-Herstellers durch. Dieser empfahl, das Substrat nach Zugabe zu den Zellen zwei Minuten zu inkubieren, um Diffusion in die Zellen, Aktivierung des Substrates (Spaltung der Esterbindung) und Verteilung an den Ort der Luziferase zu gewährleisten. Die Detektion der Signale sollte anschließend über 60 Sekunden erfolgen.

Nach einem initialen exponentiellen Anstieg zeigen die Signale in den beiden Kanälen ab ca. 40 Sekunden einen konstanten Anstieg, welcher auch in der letzten Minute (Detektion) kein Plateau erreicht (Abbildung 21 A). Da die Signale im BRET-Kanal aber direkt von der Signalhöhe im Luziferase-Kanal abhängen, sind die Ratios der einsekündigen Messintervalle über diesen Zeitraum konstant, sodass dieser als Zeitfenster für die Detektion geeignet erscheint (Abbildung 21 B).

A



ERGEBNISSE

B

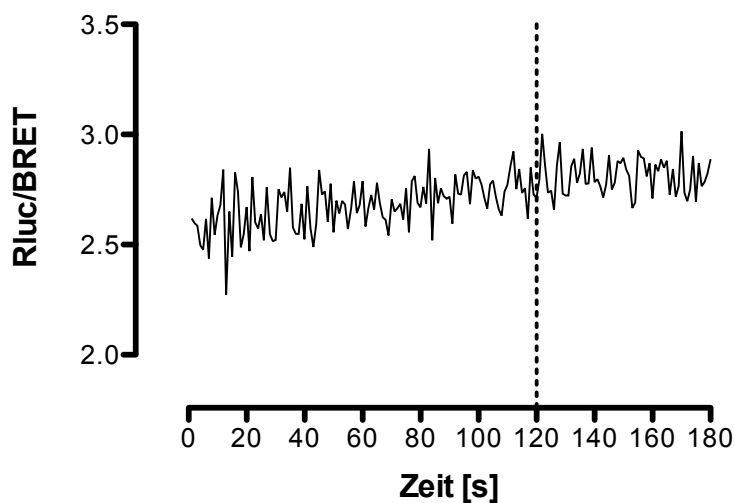


Abbildung 21: Signale von Venus-hRluc im Luziferase- und BRET-Kanal über 180 s am LUMIstar Optima

A: Rohsignale im Luziferase- (475 nm) und im BRET-Kanal (535 nm). B: Quotient der im Luziferase- bzw. BRET-Kanal gemessenen Werte. Die gestrichelte Linie bei $x=120$ s zeigt den Beginn der Detektion, welche bis zum Zeitpunkt 180 s andauert.

3.1.4.1. Optimierung des Injektionsmodus (Time Optimized Modus)

Die ursprüngliche Programmierung des LUMIstar sah vor, jedes einzelne Well einer 96-Well-Platte nach dem anderen anzusteuern und zwei Minuten nach Substratinjektion mit der Detektion zu starten. Die Messung einer gesamten 96-Well-Platte dauert auf diese Weise 4 h 48 min (17.280 s).

Zur Verkürzung der Gesamtzeit der Messung pro Multiwellplatte wurde der Time Optimized Modus der Gerätesteuerung verwendet. Damit können zwei Wells gleichzeitig angesteuert werden. Dies ermöglicht dem System, nach Injektion des Substrates in ein Well zum vorausgehenden Well zurückzukehren und dort die Signale zu detektieren. Die Dauer der Detektion pro Multiwellplatte dauert auf diese Weise 2 h 56 min 40 s (10.610 s). Die Messdauer pro Platte konnte somit auf 61,4% reduziert werden (Abbildung 22).

ERGEBNISSE

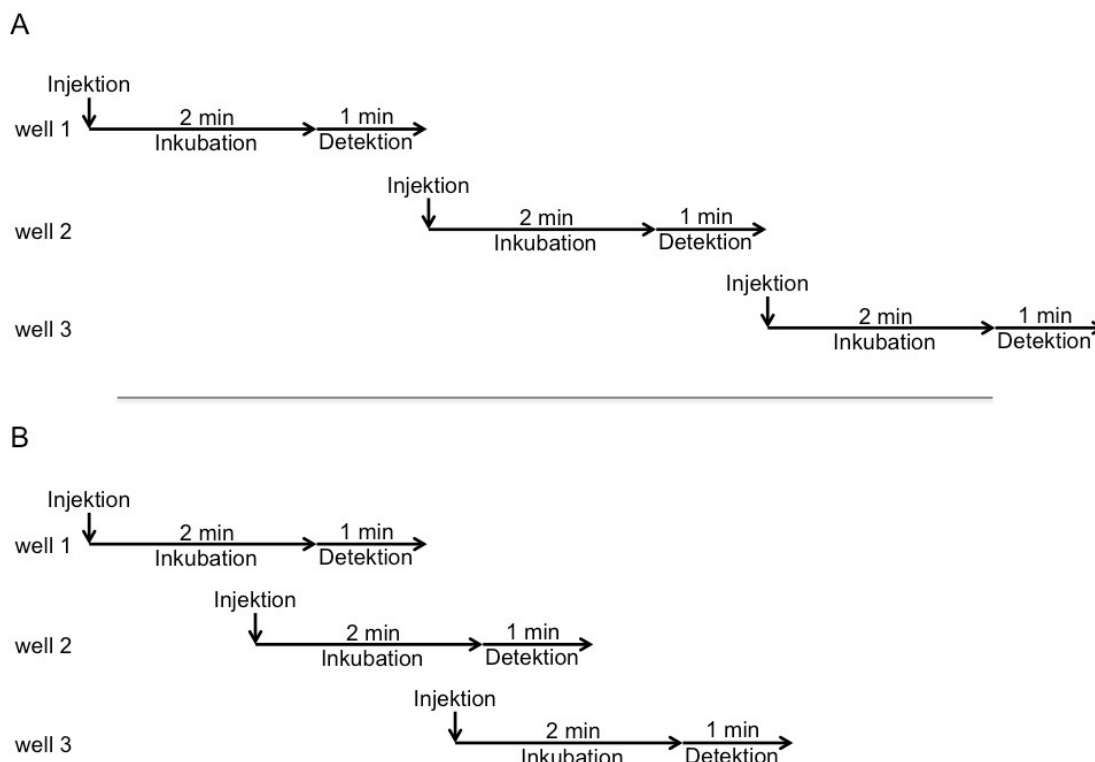


Abbildung 22: Graphische Darstellung des LUMIstar Optima Messprotokolls

A: Bei der konventionellen Messung wird das Substrat zum Zeitpunkt 0 s in Well 1 injiziert. Es folgt eine zweiminütige Inkubation gefolgt von einer Minute Detektion. Dann wiederholt sich der Vorgang für jedes weitere Well in gleicher Weise. B: Bei Nutzung des Time Optimized Modus erfolgt die Injektion des Substrates in Well 1 zum Zeitpunkt 0 s, die Injektion des Substrates in Well 2 zum Zeitpunkt 90 s, dann die Detektion der Signale in Well 1 im Intervall 121-180 s, die Injektion des Substrates in Well 3 zum Zeitpunkt 200 s und die Detektion der Signale in Well 2 im Intervall 211-270 s. Dies wird bis zum Ende der Messung wiederholt.

3.1.4.2. Verkürzung der Messzeit

Der Substrat-Hersteller empfahl die Verwendung der Messdaten aus dem Intervall 121 bis 180 Sekunden nach Substratinjektion, da dieses nach Zugabe zu den Zellen verteilt und aktiviert werden muss. Für eine automatisierte Messung der Interaktionen im Hochdurchsatzverfahren war eine Reduktion der Detektionszeit jedoch erforderlich. Um eine ähnlich gute Datenqualität zu erhalten, wurden Messungen über 15 Minuten ausgeführt. Da aber das Plattenmessgerät nur 180 Einzelmessungen aufzeichnen kann, war eine Erhöhung der Messintervalle von einer auf fünf Sekunden notwendig.

Im Rahmen einer bioinformatischen Diplomarbeit wurden 60 Sekunden-Intervalle gegen 30 s-, 20 s- und 10 s-Intervalle hinsichtlich der absoluten BRET-Ratio-Werte und deren Streuung verglichen. Dabei zeigte sich, dass 30 s-Intervalle vergleichbare Daten wie 60 s-Intervalle lieferten. Da die Luziferasesignale und die daraus berechneten BRET-Werte über 15 Minuten stabil waren (Abbildung 23) und die Messgenauigkeit ähnlich gut war, wurde die Detektionszeit auf 30 Sekunden pro Well verkürzt. Damit konnte die Messdauer pro 96-Well-Platte auf 1 h 13 min 45 s

ERGEBNISSE

(4.425 s) reduziert werden. Dies entspricht einer Reduktion auf 41,7% im Time Optimized Modus bzw. auf 25,6% verglichen mit dem konventionellen Modus.

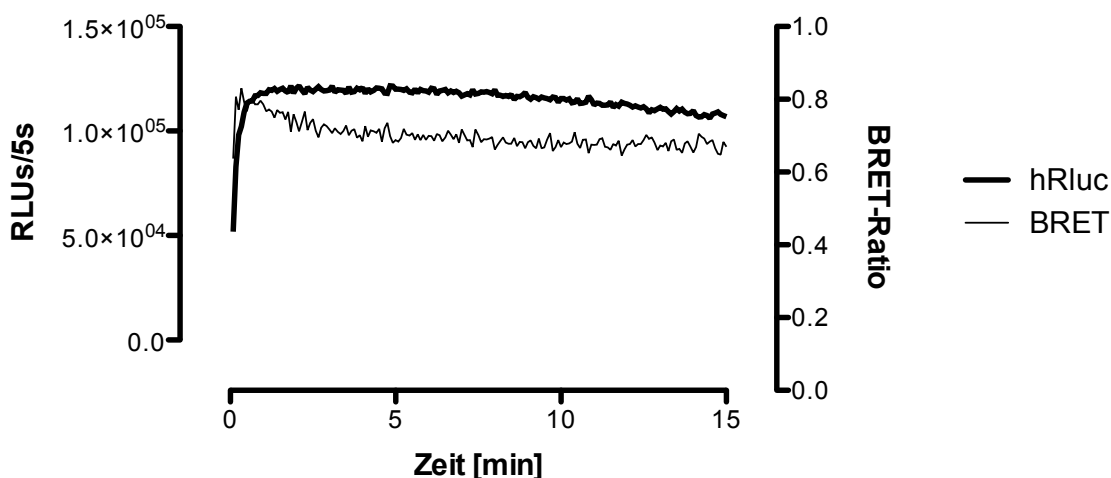


Abbildung 23: Luziferase- und BRET-Signale von Venus-hRLuc über 15 Minuten

Pro Ansatz wurden 200.000 COS-7-Zellen mit $0,8 \mu\text{g}$ DNA pro Well transfiziert und über 24 Stunden inkubiert. Nach Zugabe des Substrates ViviRenTM erfolgte die Detektion über 15 Minuten am LUMIstar Plattenlesegerät. Abgebildet sind die Mittelwerte aus Dreifachmessungen für Luziferasesignale (hRLuc), welche in 5 Sekunden-Intervallen gemessen wurden, und die daraus berechneten BRET-Ratios.

3.1.5. Detektion des Energietransfers am Spektrophotometer (BRET-Scan)

Zur Validierung der von uns entwickelten iBRET-Methode generierten wir auf der Grundlage der erstellten DEST-Vektoren Fusionskonstrukte, die den Energie-Donor (hRLuc) und -Akzeptor (Venus) kovalent gebunden enthalten und als BRET-Positivkontrolle (hRLuc-Venus und Venus-hRLuc) oder Negativkontrolle zur BRET-Positivkontrolle (hRLucSTOPSTOP-YFP) bezeichnet wurden. Die BRET-Negativkontrolle enthält im Fusionsprotein zwei Stop-Codons am Ende der Luziferase-Sequenz; bei Expression dieses Konstruktes ist somit nur Luziferaseaktivität detektierbar, nicht aber Venus-Fluoreszenz oder ein Energietransfer.

In Einzelfällen wurden BRET-Messungen am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Agilent Technologies) durchgeführt. Mit diesem Gerät kann neben Fluoreszenz auch Biolumineszenz detektiert werden. Dazu wurden 1 Million Zellen pro Ansatz am Amara Nucleofector II (gleiches Prinzip wie 96-Well Shuttle System) nukleofiziert. Es folgte die Inkubation der Zellen über 18 bis 24 Stunden im Brutschrank in 6-Well Platten. Nach Trypsinierung wurden die Zellen in 2 ml Phenolrot-freiem RPMI + 10% FCS resuspendiert und in eine 3 ml Quarz-Küvette mit Magnetrührfisch gegeben. Nach Zugabe von ViviRenTM in einer Ziel-Konzentration von $60 \mu\text{M}$ erfolgte die Detektion des Biolumineszenz- bzw. BRET-Signals in einem Spektralbereich von 400 bis 600 nm in Intervallen von 2 nm.

ERGEBNISSE

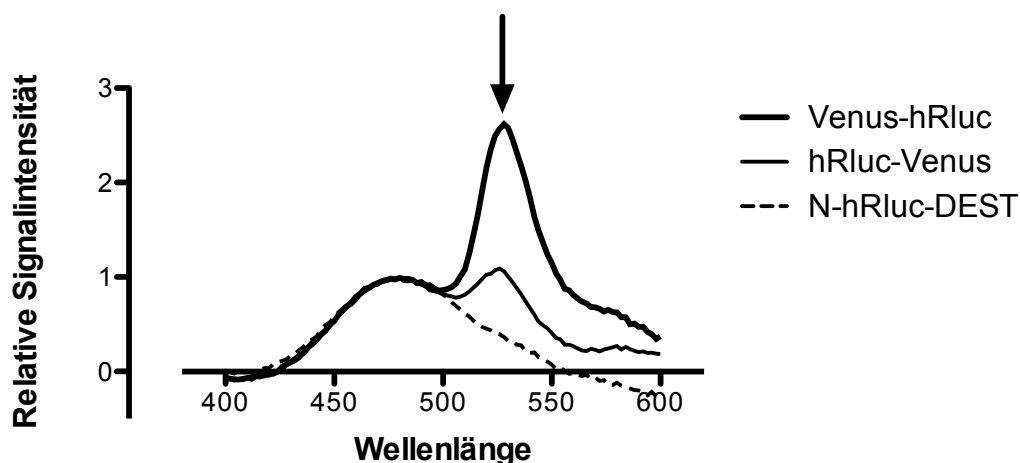


Abbildung 24: Spektrophotometrische Bestimmung des Energietransfers der BRET-Positivkontrollen im Vergleich zu N-hRluc-DEST

Dargestellt sind die Emissionsspektren der beiden BRET-Positivkontrollen Venus-hRluc und hRluc-Venus sowie von N-hRluc-DEST. Die Spektren wurden auf die Emission bei 400 nm (Nullwert) und 480 nm (Maximum = 1) nivelliert.

Abbildung 24 zeigt, dass bei den beiden Positivkontrollen hRluc-Venus und Venus-hRluc eine zweite Emissionsspitze im für den Energietransfer erwarteten Bereich von ca. 530 nm auftritt (Pfeil). Diese ist – vermutlich aus sterischen Gründen – bei Venus-hRluc höher als bei hRluc-Venus, was einen höheren Energietransfer abbildet. Das Ausmaß des Energietransfers der untersuchten Proteine ist am Spektrophotometer vergleichbar mit denen am LUMIstar in den Hochdurchsatz-Messungen.

3.1.6. Bestimmung eines Schwellenwertes für positive Interaktionen

Da zur Berechnung der BRET-Ratio immer auch eine Negativkontrolle herangezogen wird, sollte sich im Falle einer negativen Interaktion (keine Interaktion) ein Wert von Null ergeben und positive Interaktionen oberhalb dieses Wertes liegen – bei maximal 1,0. Im Experiment kann es jedoch beispielsweise bei einer starken Überexpression der Interaktionspartner zu zufälligen Interaktionen kommen. Auch große Unterschiede hinsichtlich der Signalstärke zwischen den gemessenen Proben und den Negativkontrollen (differentes Expressionsniveau) können zu leichten interexperimentellen Schwankungen bei dem gemessenen Energietransfer führen und bei negativen Interaktionen BRET-Ratio-Werte ungleich Null ergeben.

Im Rahmen einer bioinformatischen Diplomarbeit wurde ein sicherer Schwellenwert für positive Interaktionen bestimmt. Hierzu haben wir einen Datensatz bestehend aus einer Reihe von bekannten positiven (n=211) und negativen (n=144) Interaktionen (Homo- und Heterodimerisierung von acht Proteinen) untersucht und aus diesem Datensatz einen Schwellenwert für positive Interaktionen berechnet. Es fiel anhand dieses Datensatzes auf, dass – wie erwartet – ein linearer Zusammenhang zwischen den in der gleichen Probe gemessenen Werten für die Biolumineszenz- und Fluoreszenzsignale besteht. Dies beruht darauf, dass die Emission im Venus-Kanal vom Energietransfer und somit von der Luziferaseaktivität abhängt.

ERGEBNISSE

Die Untersuchung der Verteilung der Signale zeigte, dass sie weder für die positiven, noch für die negativen Interaktionen einer Normalverteilung folgen. Bei genauerer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, dass sie einer logarithmischen Normalverteilung folgen, dass also der Logarithmus der Messwerte einer Normalverteilung folgt. Ebenso waren auch die aus diesen Messwerten ermittelten BRET-Ratios log-normalverteilt. Daraus ergab sich die Möglichkeit, den Schnittpunkt der Dichtefunktionen für positive und negative Interaktionen als Schwellenwert für deren Unterscheidung zu verwenden (Abbildung 25). Dieser wurde mithilfe logistischer Regression, der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) und des Bayes-Klassifikators präziser errechnet. Dabei zeigte sich, dass der per logistischer Regression errechnete Wert von 0,035 die beste Genauigkeit (0,975) durch die höchste Sensitivität und eine gute Spezifität lieferte.

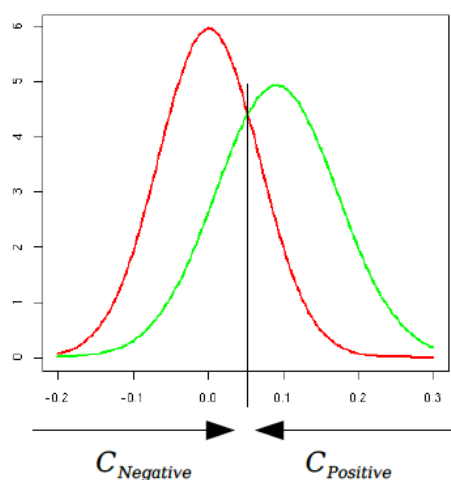


Abbildung 25: Darstellung der Dichtefunktionen für positive (grün) und negative (rot) BRET-Ratios

Der Schnittpunkt beider Kurven bildet die Trenngrenze für einen Bayes-Klassifikator (Abbildung: M. Woidy).

Um falsch-positive sowie falsch-negative Messungen weitestgehend auszuschließen, wurde in iBRET ein Graubereich definiert, der Messwerte einschließt, deren Zuordnung genauer untersucht werden sollte. Da der durch den Bayes-Klassifikator ermittelte Schwellenwert von 0,053 die höchste Spezifität (0,986) der hier verwendeten Rechenmodelle besitzt, wurde dieser Wert als obere Grenze des Graubereichs festgelegt. Die untere Grenze wurde im gleichen Abstand ($\pm 0,018$) vom Schwellenwert bei 0,017 festgelegt. Wurde bei der BRET-Analyse eines Proteinpaars in zumindest einem der vier bzw. acht möglichen Fälle (siehe Kapitel 3.1.7) ein Messwert in diesem Graubereich ermittelt, ohne dass eine weitere Messung darüber lag, so erfolgte eine genauere Analyse der Interaktion entsprechend dem in Kapitel 3.1.8 geschilderten Vorgehen.

3.1.7. Orientation matters – die Bedeutung der Struktur der Fusionsproteine für die Interaktion

Aus der Literatur und aus eigenen Voruntersuchungen ist uns bekannt, dass bei einer PPI die relative Orientierung der Reporterproteine zu den untersuchten Proteinen für die Effizienz des Energietransfers eine entscheidende Rolle spielt. Beträgt die Entfernung von Donor und Akzeptor mehr als 100 Å, so kann der Energietransfer nicht mehr stattfinden. Aus diesem Grund haben wir ein System entwickelt, in welchem ein Protein die beiden Marker hRluc bzw. Venus jeweils N-

ERGEBNISSE

oder C-terminal trägt. Daraus ergeben sich für jedes zu untersuchende Protein vier mögliche Fusionsproteine (Abbildung 26).

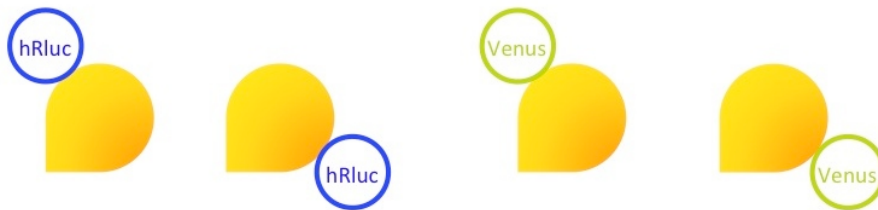


Abbildung 26: Schematische Darstellung der vier möglichen Varianten eines Fusionsproteins in iBRET

hRluc und Venus sind jeweils an den N- bzw. C-Terminus des zu untersuchenden Proteins (gelb) fusioniert.

3.1.7.1. Vier Experimente bei Untersuchung der Homodimerisierung

Bei der Untersuchung einer Homodimerisierung ergeben sich aus den vier Expressionskonstrukten vier mögliche Kombinationen für eine Interaktion (Abbildung 27). Es erscheint nach unserer Erfahrung äußerst schwierig, Voraussagen darüber zu treffen, welche *tag*-Orientierung positive Interaktionssignale zeigen wird.

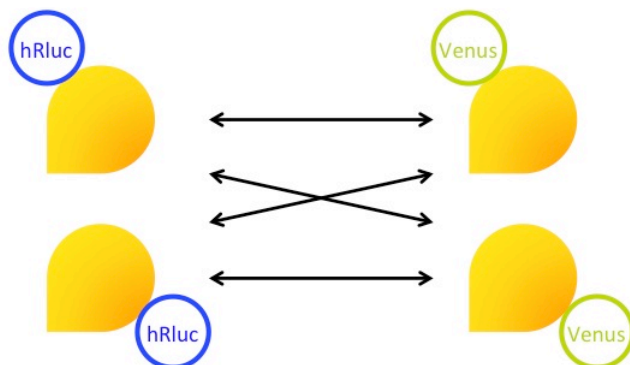


Abbildung 27: Schematische Darstellung der vier möglichen Interaktionen bei Untersuchung einer Homodimerisierung

Die vier Doppelpfeile deuten die vier möglichen Kombinationen an.

3.1.7.2. Acht Experimente bei Untersuchung der Heterodimerisierung

Bei Untersuchung einer Heterodimerisierung ergeben sich aus den insgesamt acht Fusionsproteinen acht mögliche Kombinationen der Interaktion (Abbildung 28).

ERGEBNISSE

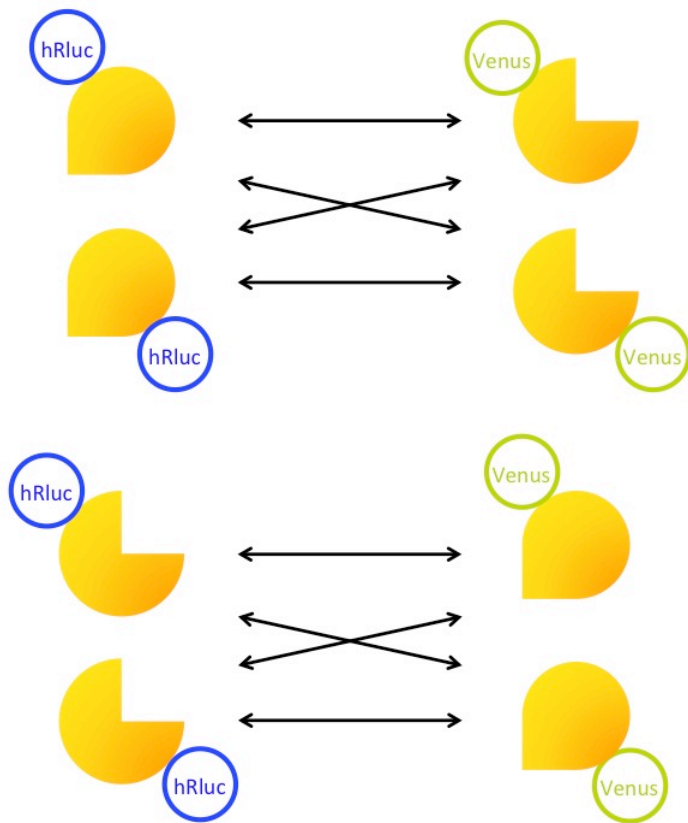


Abbildung 28: Schematische Darstellung der acht möglichen Interaktionen bei Untersuchung einer Heterodimerisierung

Die acht Doppelpfeile deuten die acht möglichen Kombinationen an.

3.1.8. Modifikation der Akzeptor/Donor-Ratio zur Unterscheidung richtig-positiver von falsch-positiven Ergebnissen

Mit BRET können PPI und Protein-Konformationsänderungen in lebenden Zellen in Echtzeit untersucht werden. Unter bestimmten Umständen treten aber auch unspezifische Interaktionen auf, beispielsweise bei starker Überexpression von Membranproteinen. Diese falsch positiven Interaktionen gilt es zu erkennen und auszuschließen. Durch Variation des absoluten und relativen Expressionsniveaus der beiden Fusionsproteine kann dies erzielt werden (Couturier *et al.* 2002; James *et al.* 2006).

Ist bei einer positiven (spezifischen) Interaktion das Akzeptor/Donor-Verhältnis konstant, so ist der Energietransfer unabhängig vom absoluten Expressionsniveau der beiden Partner. Bei steigender Proteinmenge bleibt die BRET-Ratio also gleich, da der Anteil von Akzeptor-Donor-Paaren gleich bleibt. Variiert man jedoch das Akzeptor/Donor-Verhältnis bei gleich bleibender Gesamtzahl der Interaktionspartner, nimmt der Energietransfer mit steigenden Akzeptormengen zu, bis es zu einer Sättigung des Donors mit Akzeptor kommt. Eine Zunahme der Akzeptor/Donor-Ratio führt also zu einer Zunahme der BRET-Ratio, da der Anteil des Energietransfers an der vom Donor abgegebenen Energie zunimmt. Diese Zunahme der BRET-Ratio geschieht entsprechend einer Hyperbel, wobei die BRET-Ratio ein Plateau erreicht, sobald alle Donor-Proteine mit Akzeptor-

ERGEBNISSE

Proteinen gesättigt sind (Mercier *et al.* 2002; James *et al.* 2006).

Anders verhält sich dies bei unspezifischen (falsch positiven) Interaktionen. Hier ist der Energietransfer abhängig von der Rezeptordichte. Die BRET-Ratio steigt mit zunehmender Proteinmenge, da sich mit Zunahme der absoluten Zahl von Interaktionspartnern auch die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Begegnung erhöht. Wird das Akzeptor/Donor-Verhältnis erhöht, nimmt auch langsam die BRET-Ratio zu, da auch hier die Sättigung von Donor- mit Akzeptor-Proteinen steigt; dieser Anstieg folgt aber einer linearen Funktion (Mercier *et al.* 2002; Hamdan *et al.* 2006).

Die hier diskutierten Aspekte sollen nun anhand von Beispielen illustriert werden.

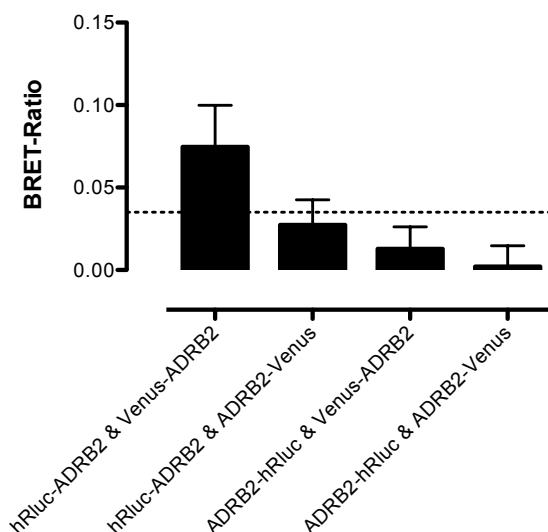
3.1.8.1. Untersuchung einer positiven Interaktion: Homodimerisierung von ADRB2

Bei ADRB2 handelt es sich um den adrenergen β_2 -Rezeptor, ein G-Protein-gekoppeltes Membranprotein, welches in seiner aktiven Form Homodimere bildet (Angers *et al.* 2000; Cherezov *et al.* 2007). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Homodimerisierung von ADRB2 werden nun dargestellt.

Aus Abbildung 29 A geht hervor, dass ADRB2 im BRET-System zumindest in der Kombination mit den beiden Markern am N-Terminus einen Energietransfer und somit eine PPI eingeht. Diese liegt für diese Kombination oberhalb des Schwellenwertes für eine positive Interaktion von 0,035. Das Akzeptor/Donor-Verhältnis liegt bei diesen Messungen bei 3:1.

Untersucht man diese Interaktion, wie in Abbildung 29 B dargestellt, bei Variation der Akzeptor/Donor-Ratio, zeigt sich eine deutliche exponentielle Zunahme des Energietransfers bei Erhöhung der Akzeptor/Donor-Ratio, was eine positive Interaktion dieser beiden Fusionsproteine und somit die Homodimerisierung von ADRB2 weiter stützt.

A



ERGEBNISSE

B

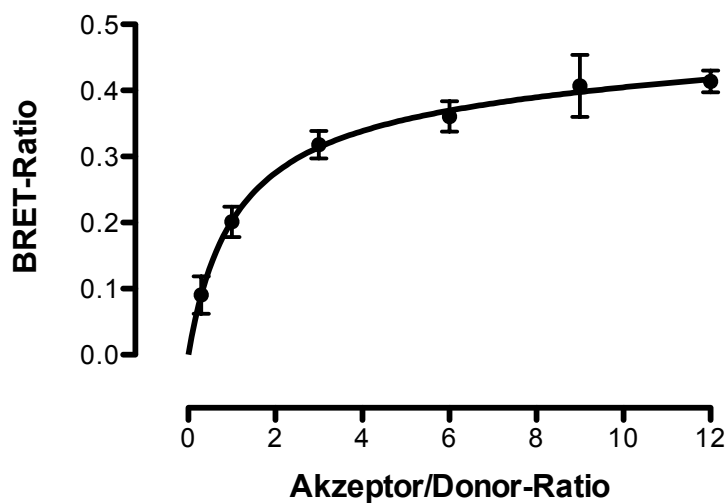


Abbildung 29: Homodimerisierung von ADRB2

A: Darstellung der vier möglichen Kombinationen für die Homodimerisierung. Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelmessungen. Die gestrichelte Linie stellt die Grenze für eine positive Interaktion dar (BRET-Ratio = 0,035). B: Nonlineare Regression bei Variation der Akzeptor/Donor-Ratio für die Dimerisierung von hRluc-ADRB2 & Venus-ADRB2.

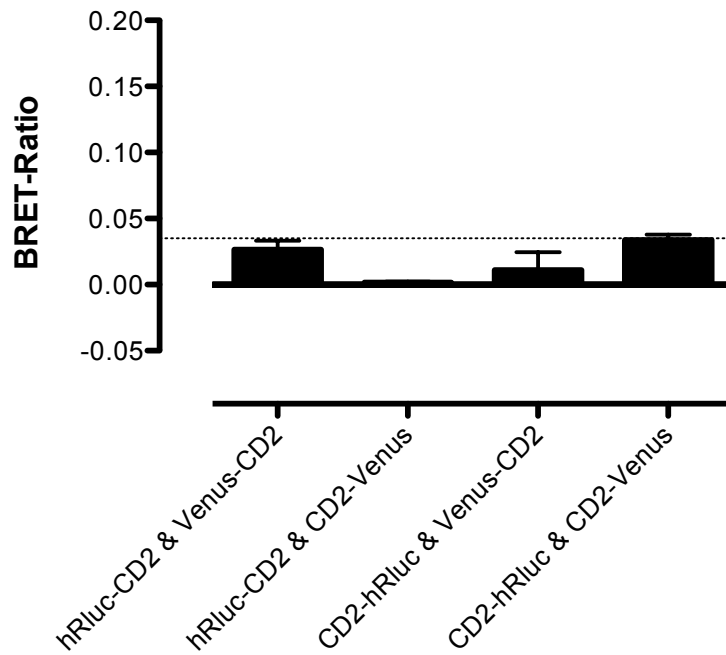
3.1.8.2. Untersuchung einer negativen Interaktion: Homodimerisierung von CD2

CD2 (*cluster of differentiation 2*) ist ein T-Zell-Antigen, das auf über 95% der Thymozyten und auf allen T-Zellen im peripheren Blut exprimiert wird (Sewell *et al.* 1986). Es wird früh in der T-Zell-Differenzierung exprimiert und ist an der Bindung von Erythrozyten beteiligt. Bei CD2 handelt es sich um ein Transmembran-Glykoprotein, welches Ähnlichkeit zur Immunglobulin-Familie hat. Das Protein ist 327 AS groß und wird vom *T11*-Gen kodiert, das 5 Exons besitzt. Durch Bindung von CD58 auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen wird die Immunantwort vermittelt. Diese Interaktion erfolgt jeweils im N-terminalen Bereich beider Proteine; bei CD2 sind die AS 1-105 für die Bindung verantwortlich (Wang, J. H. *et al.* 1999). Eine Homodimerisierung von CD2 ist nicht bekannt.

Die Untersuchung der negativen Interaktion von CD2 erbrachte in zwei der möglichen vier Kombinationen (hRluc-CD2 & Venus-CD2 sowie CD2-hRluc & CD2-Venus) grenzwertige BRET-Ratios (Abbildung 30 A). In der Sättigungsuntersuchung bei Variation der Akzeptor/Donor-Ratio fand sich ein linearer Verlauf der BRET-Ratio (Abbildung 30 B); somit konnte eine Interaktion dieser zwei Proteine ausgeschlossen werden.

ERGEBNISSE

A



B

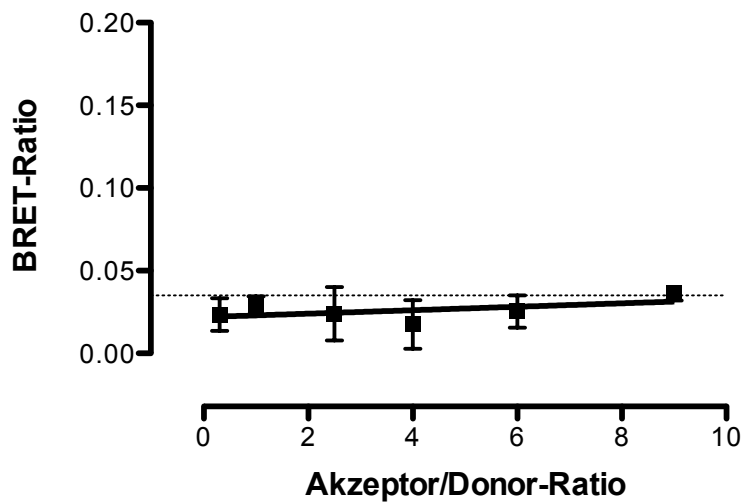


Abbildung 30: Homodimerisierung von CD2

A: Untersuchung der Homodimerisierung von CD2 anhand der vier möglichen Kombinationen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelmessungen. Die gestrichelte Linie stellt die Grenze für eine positive Interaktion dar (BRET-Ratio = 0,035). B: Lineare Regression bei Variation der Akzeptor/Donor-Ratio der unklaren Homodimerisierung von CD2-hRluc & CD2-Venus. Die Sättigungskurve von hRluc-CD2 & Venus-CD2 ist hier nicht abgebildet.

3.2. Validierung bekannter Interaktionen in verschiedenen zellulären Kompartimenten

Proteine können sich in ihrer Struktur und Funktion erheblich voneinander unterscheiden. Zudem befinden sie sich in verschiedenen Kompartimenten, in denen unterschiedliche Milieus auf die Reporter Venus und hRluc einwirken. Auch sind die räumlichen Gegebenheiten verschieden, so besitzen Membranproteine weniger räumliche Freiheitsgrade als zytoplasmatische Proteine. Auch kann die Membran ein Hindernis zwischen den Reportern darstellen – sofern diese sich auf unterschiedlichen Seiten der Membran befinden. Um derartige Einflussfaktoren auf unser BRET-System zu untersuchen, haben wir die Interaktionen von Proteinen aus unterschiedlichen Kompartimenten untersucht.

3.2.1. Zellmembran: ADRB2

Wie in Kapitel 3.1.8.1 dargestellt, ist ADRB2 ein Rezeptor in der zytoplasmatischen Zellmembran, der Homodimere bildet. Bei Untersuchung der PPI mittels BRET fällt auf, dass der höchste Energietransfer dann auftritt, wenn beide Reporter am N-Terminus von ADRB2 und somit extrazellulär lokalisiert sind (siehe Abbildung 29 A). Dies beweist zudem, dass das Substrat ViviRenTM nach intrazellulärer Aktivierung die Zellmembran permeiert und extrazellulär umgesetzt wird.

Die Interaktionsdomänen von ADRB2 sind bislang nicht abschließend untersucht, aber vermutlich spielen die N- bzw. C-terminal gelegenen Transmembrandomänen I bzw. VIII eine entscheidende Rolle. Zudem kommt es durch Ligandenbindung zu weiteren Effekten bei der Dimerisierung (Angers *et al.* 2000; Cherezov *et al.* 2007).

3.2.2. Zytoplasma und Peroxisom: PEX19 und PEX3

PEX3 und PEX19 sind zwei Peroxine, die bei der Biogenese von Peroxisomen eine entscheidende Rolle spielen (siehe 1.4.5). Bei Defekten eines dieser beiden Proteine kommt es zu schweren klinischen Manifestationen aus dem Zellweger-Spektrum. Auf zellulärer Ebene führen Defekte dieser Peroxine zum Fehlen von Peroxisomen, ein Hinweis darauf, dass diese für die Bildung der peroxisomalen Membran wichtig sind (Suzuki *et al.* 2001). PEX3 ist ein integrales Membranprotein, welches als *docking factor* für PEX19 fungiert. Peroxisomale Membranproteine werden im Zytoplasma vom zytosolischen Rezeptor PEX19 gebunden und durch Andocken an PEX3 in die peroxisomale Membran transloziert (Fang *et al.* 2004).

Die Interaktion von PEX3 und PEX19 ist bereits mit mehreren Methoden beschrieben worden (Snyder *et al.* 1999; Sacksteder *et al.* 2000; Muntau *et al.* 2003; Jones *et al.* 2004). Es konnte bei genauerer Untersuchung gezeigt werden, dass für die Interaktion v.a. die 44 N-terminalen Aminosäuren von PEX19 entscheidend sind (Sato *et al.* 2010). Etwas komplexer stellte sich die Suche nach Bindungsstellen in PEX3 dar. Hier konnten mehrere Regionen eingegrenzt werden, an die das N-terminale PEX19-Fragment bindet (Sato *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2012). Allerdings

ERGEBNISSE

sind diese drei Regionen sowohl N- als auch C-terminal gelegen.

Bei der BRET-Messung fällt auf, dass eine positive Interaktion für drei von acht möglichen *tag*-Orientierungen auftritt. Bei allen drei PEX3-Fusionsproteinen liegt der *tag* N-terminal, bei PEX19 zweimal C-terminal und einmal N-terminal (Abbildung 31).

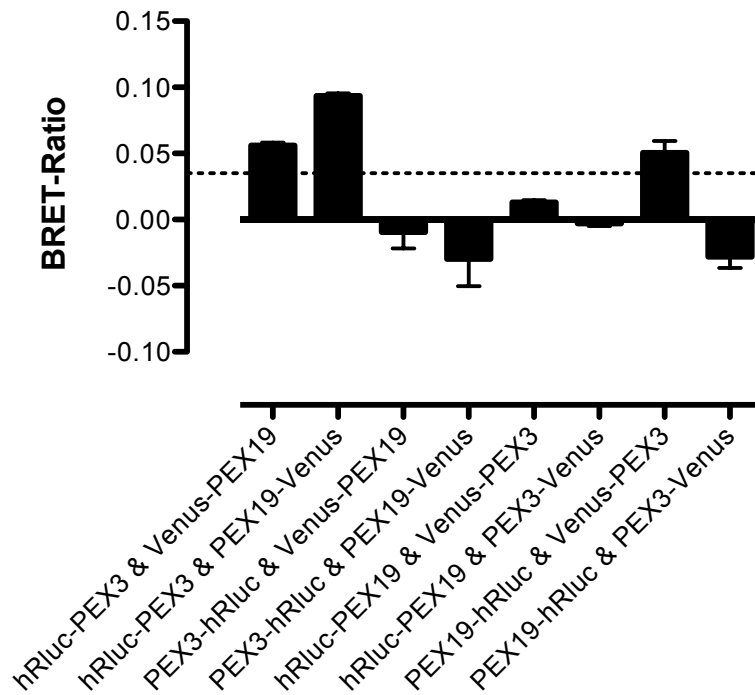


Abbildung 31: Heterodimerisierung von PEX3 und PEX19

3.2.3. Peroxisom: ABCD1

Der ABC-Halbtransporter ABCD1 liegt als Homodimer in der peroxisomalen Membran. Er ist bei der X-chromosomal vererbten Adrenoleukodystrophie (XALD) mutationsbedingt defekt (siehe 1.4.7).

Bei der BRET-Messung finden sich positive Signale bei zwei der vier möglichen Kombinationen (Abbildung 32). Der Energietransfer funktioniert bei C-terminaler Orientierung beider Reporterproteine am besten, somit also bei deren zytoplasmatischer Lokalisation (Contreras *et al.* 1996). Es findet aber auch bei der Kombination ALD-hRluc & Venus-ALD über die peroxisomale Membran hinweg ein Energietransfer oberhalb des Schwellenwertes für positive Interaktionen statt.

ERGEBNISSE

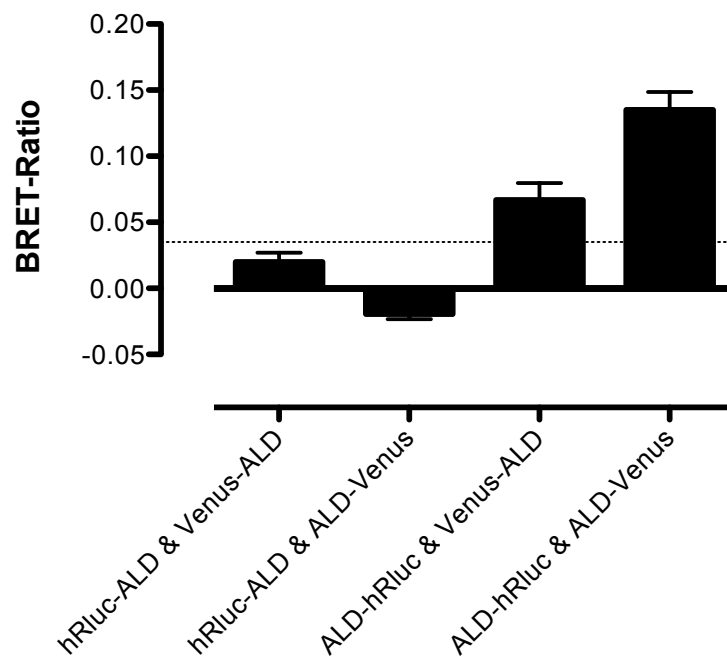


Abbildung 32: Homodimerisierung von ABCD1

ERGEBNISSE

3.3. Homodimerisierung von PEX26

PEX26 ist der Rezeptor für den PEX1/PEX6-Komplex in der peroxisomalen Membran und verantwortlich für genetische Defekte der peroxisomalen Biogenese (siehe 1.4.6) (Matsumoto *et al.* 2003a). Wir haben die PEX26-Dimerisierung mittels BRET mit jeweils N- und C-terminal gelegenen Reporterproteinen in lebenden COS-7-Zellen an intakten Zellorganellen untersucht. Dabei fanden wir eine positive Interaktion, was für eine Di- oder Multimerisierung von PEX26 spricht.

3.3.1. Charakterisierung der neu identifizierten PPI: Homodimerisierung von PEX26

Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, findet bei jeweils N-terminal (zytoplasmatisch) gelegenen Reporterprotein der höchste Energietransfer statt. Dieser liegt deutlich oberhalb des Schwellenwertes für eine positive Interaktion.

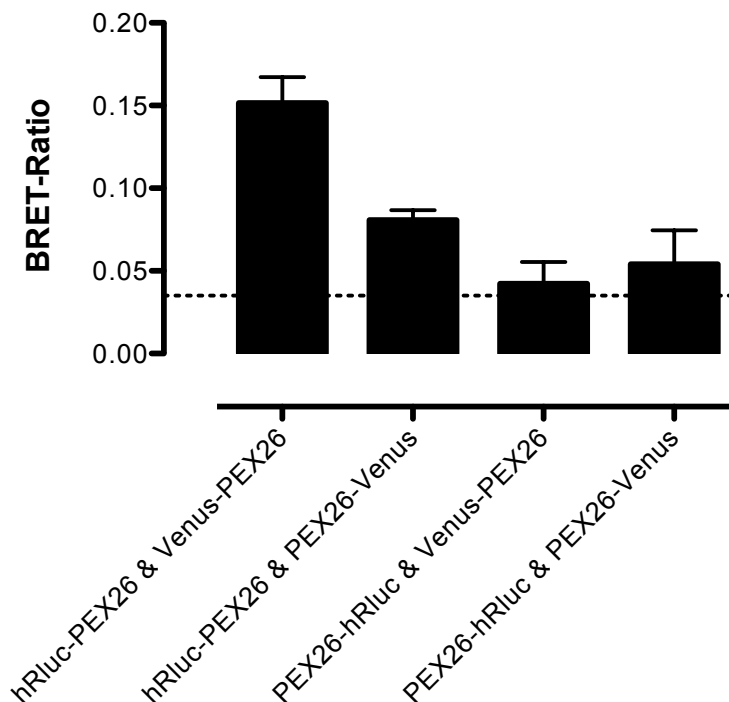


Abbildung 33: Homodimerisierung von PEX26

ERGEBNISSE

3.3.2. Intrazelluläre Lokalisation der Venus-Fusionsproteine von PEX26

Um einen Hinweis auf die Funktionalität der Fusionsproteine zu erhalten, untersuchten wir die Lokalisation der Venus-Konstrukte fluoreszenzmikroskopisch. Dabei zeigte sich für beide Proteine eine Lokalisation am Peroxisom. Dies konnte in der Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen Katalase, einem Matrixprotein des Peroxisoms zur H_2O_2 -Entgiftung, bestätigt werden (Abbildung 34).

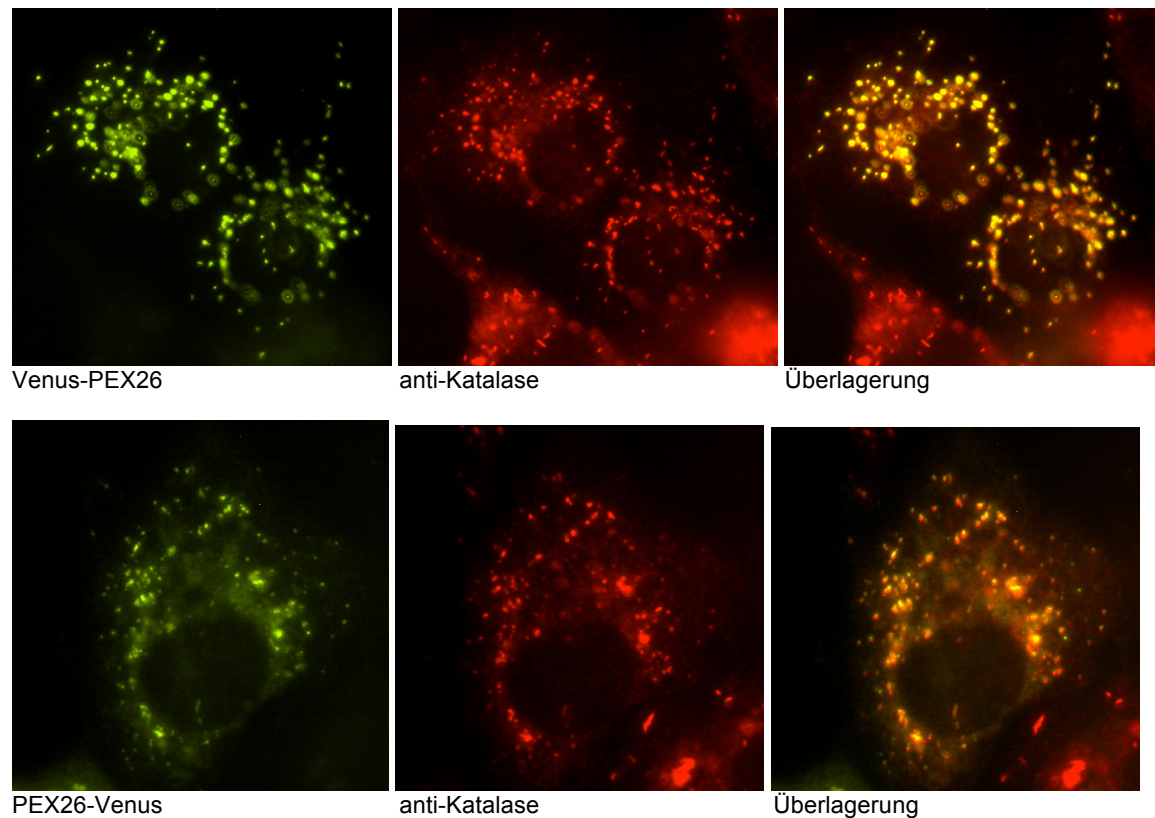


Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der zellulären Lokalisation von Venus-PEX26 und PEX26-Venus

Dargestellt sind im grünen Kanal jeweils die beiden Fusionsproteine Venus-PEX26 bzw. PEX26-Venus. Im roten Kanal ist der Rhodamin-gefärbte Antikörper gegen Katalase (peroxisomales Matrix-Protein) sichtbar gemacht. In der Überlagerung sind die Aufnahmen des grünen und des roten Kanals zur Bestätigung der Co-Lokalisation übereinander gelegt.

3.3.3. Eingrenzung der Interaktionsdomäne an verkürzten PEX26-Konstrukten

Es ist bekannt, dass PEX26 im N-terminalen zytoplasmatischen Bereich zwischen den Aminosäuren (AS) 29-174 mit dem PEX1/PEX6-Komplex interagiert (Weller *et al.* 2005). Nach Feststellung der Homodimerisierung stellt sich die Frage, in welchem Bereich des Proteins die Bindung zur Homodimerisierung stattfindet. Dazu generierten wir mittels PCR eine Reihe von PEX26-Fragmenten (siehe Kapitel 3.1.2.1) und klonierten diese über *entry clones* in die DEST-Vektoren des BRET-Systems. Mit diesen führten wir Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

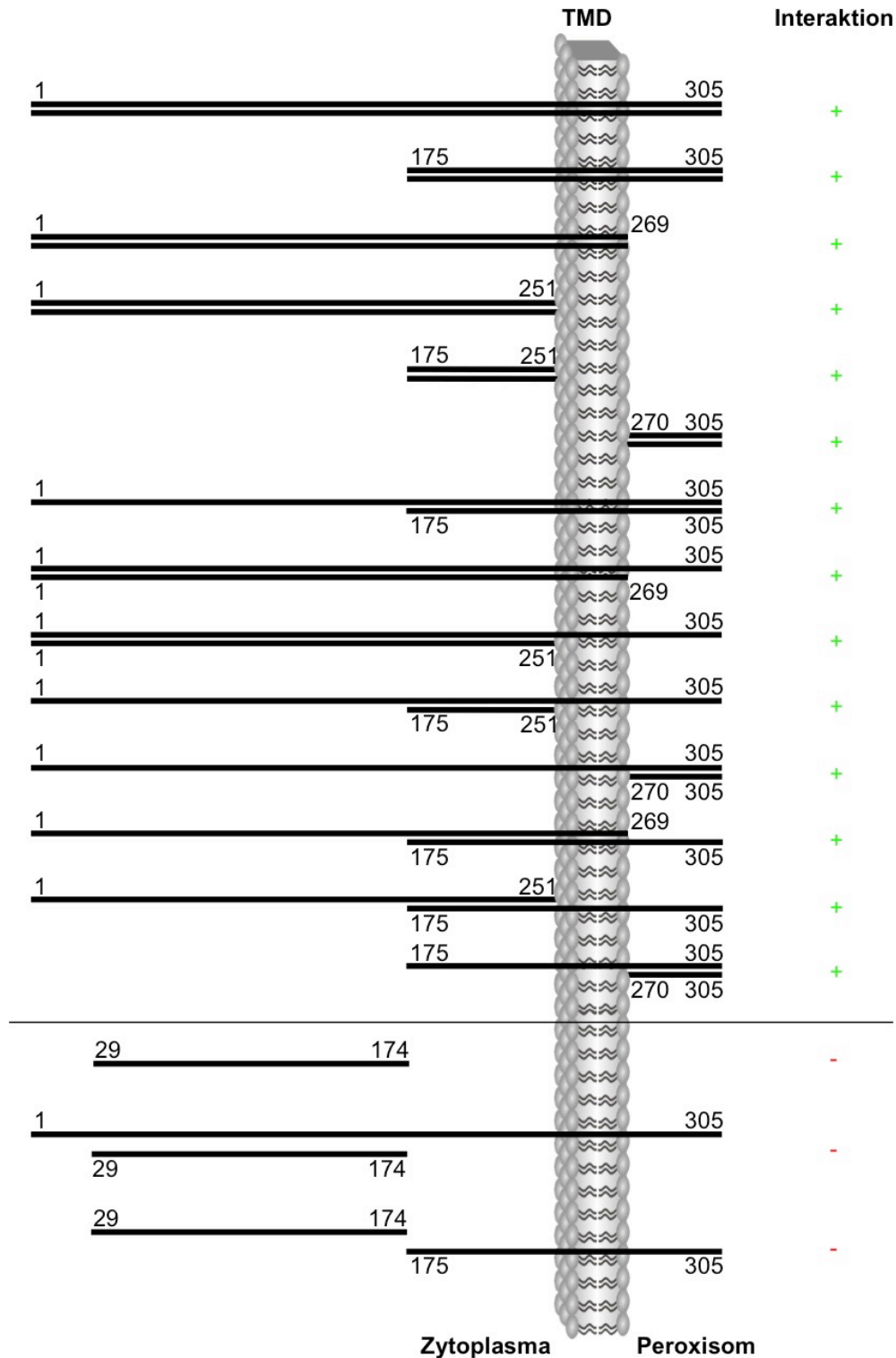


Abbildung 35: Eingrenzung der Interaktionsdomäne für die PEX26-Homodimerisierung

Schematische Darstellung der Ergebnisse von Interaktionsexperimenten mittels BRET für PEX26fl (1-305) und die PEX26-Verkürzungskonstrukte 29-174, 1-251, 1-269, 175-305, 175-251 und 270-305. Positive Interaktionen sind als Doppelstriche gezeichnet und mit einem „+“ bei „Interaktion“ markiert. Negative Interaktionen sind als Einzelstriche mit der Kennzeichnung „-“ gekennzeichnet. TMD = Transmembrandomäne.

PEX26 *full length* (fl; 1-305) bildet Homodimere, ebenso die fünf Fragmente 175-305, 1-269, 1-251, 175-251 und 270-305. Das C-terminale Fragment 175-305 und das Fragment 1-269 beinhalten die Transmembran-Domäne (TMD). Die Fragmente 1-251 und 175-251 sowie das C-

ERGEBNISSE

terminale Fragment 270-305 enthalten diese nicht. Ersteres repräsentiert den gesamten N-terminalen Abschnitt bis zur TMD und letzteres liegt im kompletten Protein auf der peroxisomalen Seite der Membran in der peroxisomalen Matrix.

PEX26fl bildet Heterodimere mit den Fragmenten 175-305, 1-269, 1-251, 175-251 und 270-305. Auch bilden die Fragmente 1-269 und 175-305, 1-251 und 175-305 bzw. 175-305 und 270-305 Heterodimere.

Die PEX1/PEX6-Bindungsdomäne 29-174 bildet keine Homodimere und es bindet weder PEX26fl noch das Fragment 175-305.

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Untersuchungen die Schlussfolgerungen ziehen, dass (1) die Dimerisierungs-Domäne am C-terminus lokalisiert ist (AS 175-305) und dass (2) es vermutlich zwei wichtige Bindungsdomänen gibt, die auch unabhängig voneinander funktionieren, eine im Bereich der AS 175-251 und eine im C-terminalen Bereich des Proteins (AS 270-305).

3.3.4. Untersuchung der Splice-Variante PEX26 delta-Exon5

Die Splice-Variante PEX26 delta-Exon 5 (Δex5) besitzt keine Transmembrandomäne (Abbildung 36) und ist im Zytoplasma lokalisiert (Weller *et al.* 2005). Trotzdem ist diese Variante in der Lage, die Funktion des gesamten PEX26-Proteins im Sinne der peroxisomalen Biogenese zu erfüllen, was von Weller *et al.* durch eine Aktivierung von PEX1 durch vorübergehende Bindung des PEX26/PEX6-Komplexes erklärt wird. Interessant erschien die Frage, ob PEX26 Δex5 auch ohne die TMD Homodimere bilden kann.

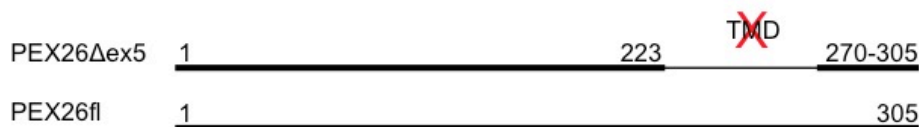


Abbildung 36: Schematische Darstellung von PEX26 Δ ex5 und PEX26fl

Bei PEX26 Δ ex5 fehlen die Aminosäuren 224 bis 269 einschließlich der TMD. TMD = Transmembrandomäne

3.3.4.1. Klonierung von *pENTR PEX26 Δ ex5* mittels *In-Fusion® PCR Cloning System* (Clontech)

Zur Charakterisierung der PEX26-Splice-Variante Δ ex5 wurden die Gateway *entry clones* pENTR PEX26 Δ ex5 STOP (für Konstrukte mit N-terminalem Reporterprotein) und PEX26 Δ ex5 Δ STOP (für Konstrukte mit C-terminalem Reporterprotein) kloniert. Dabei wurden ausgehend vom Konstrukt pENTR PEX26 zunächst mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) und den unten genannten Primern die drei PCR-Fragmente pENTR PEX26 Exon 1-4, PEX26 Exon 6 STOP und PEX26 Exon 6 Δ STOP hergestellt.

ERGEBNISSE

- Primer für pENTR PEX26 Exon 1-4:

| | |
|----------------|-----------------------------|
| pENTR PEX26 fo | AACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGC |
| pENTR PEX26 re | CTTCCAGGTTTGGCTTCTGGGC |

- Primer für PEX26 Exon 6 STOP und Δ STOP:

| | |
|------------------------|---|
| PEX26 815 fo | AGAAGCCAAACCTGGAAGCTTCCCCTTCCTCCCTGCACTTC |
| PEX26 918 re STOP | GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTCACGGATGCGGAGCTG |
| PEX26 918 re deltaSTOP | GTACAAGAAAGCTGGGTTACAGTCACGGATGCGGAGCTG |

Diese drei PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Gelelution aus dem Gel extrahiert. Mittels der Anleitung „*Procedure for Gel-purified PCR Inserts*“ des In-Fusion® PCR Cloning System wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers (Clontech) jeweils die PCR-Fragmente pENTR PEX26 Exon 1-4 und PEX26 Exon 6 STOP bzw. Δ STOP miteinander ligiert. Dabei wurde das Online-Werkzeug In-Fusion® Molar Ratio Calculator (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>) zur Berechnung der jeweils benötigten DNA-Menge verwendet. Nach Transformation in Fusion-Blue™ Competent Cells wurden mehrere Klone von der Agarplatte gepickt und per Restriktionsverdau und Sequenzanalyse überprüft. Das fehlerfreie Konstrukt wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

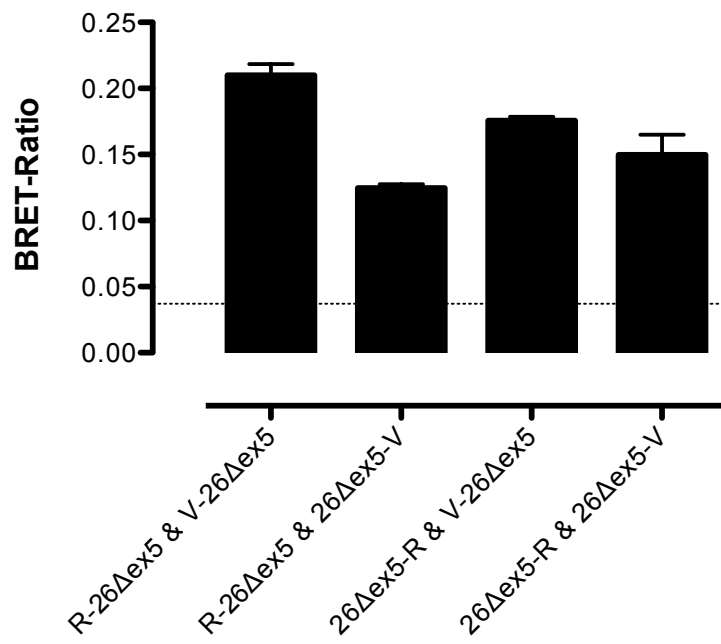
3.3.4.2. Interaktionen der PEX26 Δ ex5 Splice-Variante

Wie in Abbildung 37 A gezeigt, bildet auch die zytosolisch und im ER lokalisierte Splice-Variante PEX26 Δ ex5 Homodimere. Dabei ist die Effizienz des Energietransfers höher als bei PEX26fl (Abbildung 33). Auch interagiert die Splice-Variante mit PEX26fl (Abbildung 37 B), wobei der Ort der Interaktion innerhalb der Zellen unklar ist.

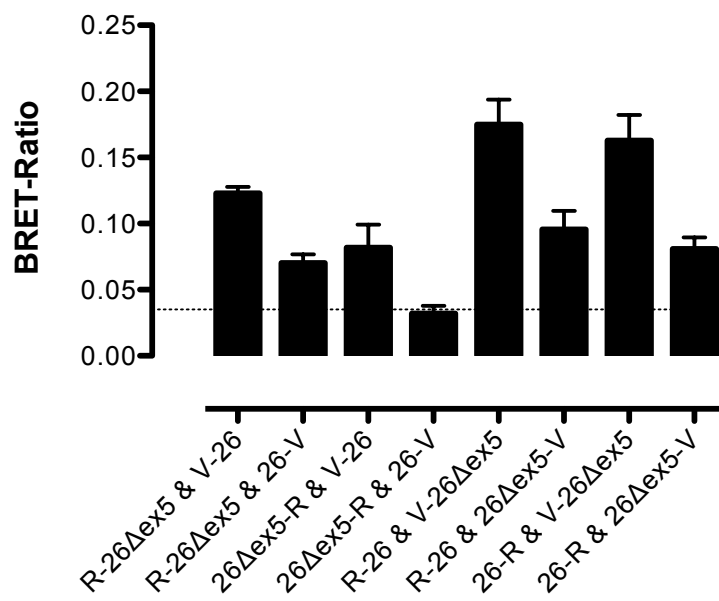
Zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von PEX26 Δ ex5 mit sich selbst aber auch mit PEX26fl führten wir Untersuchungen analog zu denen bei der Suche nach der Interaktionsdomäne von PEX26fl durch (siehe Kapitel 3.3.3). Dabei zeigte sich, dass PEX26 Δ ex5 mit dem Fragment PEX26 270-305 interagiert, jedoch auch mit 175-305 (Abbildung 37 C). Zur weiteren Eingrenzung der Interaktionsdomäne untersuchten wir die Interaktion der Splice-Variante mit dem Fragment 175-251. Diese war ebenfalls positiv. Somit sind neben den C-terminal gelegenen AS 270-305 auch die AS 175-223 (AS 224-269 fehlen in PEX26 Δ ex5) wesentlich für die PEX26 Δ ex5-Homodimerisierung sowie für die Heterodimerisierung von PEX26 Δ ex5 mit PEX26fl.

ERGEBNISSE

A



B



ERGEBNISSE

C

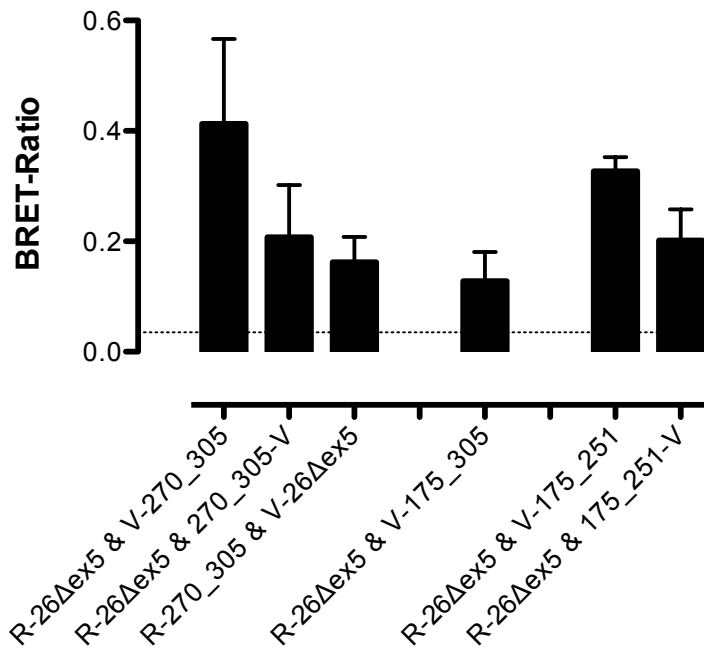


Abbildung 37: Interaktionsexperimente der Splice-Variante PEX26Δex5

A: Homodimerisierung von PEX26Δex5. B: Heterodimerisierung von PEX26fl mit PEX26Δex5. C: Heterodimerisierung von PEX26Δex5 mit den Fragmenten 270-305 (links), 175-305 (Mitte) und 175-251 (rechts); dargestellt sind hier nur die positiven Interaktionen.

R = hRluc; V = Venus; 26 = PEX26; Δex5 = delta-Exon 5; 270_305 = PEX26 270-305; 175_305 = PEX26 175-305; 175_251 = PEX26 175-251

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein BRET-basiertes *in vivo* Hochdurchsatz-Verfahren zur Detektion von PPI erfolgreich aufgebaut. Die Validität des Verfahrens konnte durch Bestätigung bekannter Interaktionen wie der Homodimerisierung von ABCD1 bzw. ADRB2 und der Heterodimerisierung von PEX3 und PEX19, sowie anhand der negativen Interaktion von CD2 nachgewiesen werden. Zudem wurde eine neue Interaktion, die Homodimerisierung von PEX26, entdeckt und näher charakterisiert.

4.1. Aufbau des BRET-basierten *in vivo*-Hochdurchsatz Verfahrens

Für den erfolgreichen Aufbau des Verfahrens wurden die einzelnen Elemente gezielt hinsichtlich ihrer Hochdurchsatz-Fähigkeit ausgewählt und aneinandergefügt. Dabei spielte auch die *in vivo*-Detektion eine bedeutende Rolle, um PPI im physiologischen Kontext zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurden die BRET-Reporterproteine Rluc und YFP in das System eingeführt. Durch gezielte Auswahl von hRluc als Donor konnten die Expression und infolgedessen die Signalintensität von Rluc deutlich um den Faktor 3,3 gesteigert werden. Der Akzeptor YFP wurde durch Venus ersetzt, welches durch gentechnische Modifikation aus EYFP erstellt wurde. Venus weist durch die Einführung der vier Mutationen F64L, M153T, V163A und S175G eine beschleunigte Proteinfaltung bei 37°C und eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Protonen und Chlorid-Ionen auf. Durch die zusätzliche Mutation F46L wird die Oxidation des Fluorophors, der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Reifung, beschleunigt. Somit kommt es zu verbesserten Fluoreszenzeigenschaften bzw. einer höheren Signalintensität. Diese Veränderungen führten zu einer höheren Sensitivität der Technologie.

Da bekannt ist, dass Protein-tags sowohl PPI als auch deren Signal beeinflussen können (Soukupova *et al.* 1999; Bouvier *et al.* 2007), wurden mit dem hier beschriebenen Verfahren alle möglichen Kombinationen von N- bzw. C-terminalen Fusionsproteinen untersucht, wodurch die *coverage* der PPI gesteigert wurde. Unter *coverage* wird der Anteil der mit einer Technologie entdeckten PPI an den bekannten PPI verstanden, somit also die Sensitivität der Methode. In diesem Fall wurden bei jedem Proteinpaar acht Kombinationen von Donor und Akzeptor untersucht. Bei der Untersuchung einer Homodimerisierung waren es vier Kombinationen.

Um die hierfür erforderliche Vielzahl von Expressionskonstrukten generieren zu können, wurden im zweiten Schritt des Methodenaufbaus Hochdurchsatz-fähige Gateway®-DEST-Vektoren erstellt. Diese enthalten jeweils hRluc oder Venus N- bzw. C-terminal der zu untersuchenden Proteine. Die daraus gebildeten Expressionskonstrukte können in adhärenzte Zelllinien transfiziert und dort exprimiert werden. Es kann jedoch auch in diesem Fall nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es trotz Verwendung der vier verschiedenen Fusionsvarianten eines Proteins zu

DISKUSSION

einer Behinderung der PPI kommt – zumal die beiden Reporterproteine mit 36 kDa (hRluc) bzw. 27 kDa (Venus) verhältnismäßig groß sind. Denkbar sind eine durch das *tagging* verursachte Fehlfaltung des Proteins, eine sterische Behinderung der PPI oder eine Störung der Proteinfunktion durch den Reporter. Durch mikroskopische Beurteilung des Venus-Signals und durch Messung der Luziferaseaktivität bei der BRET-Messung wurde die Expression der beiden Reporter und damit der Fusionsproteine kontrolliert. Damit konnte als Voraussetzung für ihre Funktion auch die Lokalisation der Venus-Konstrukte sowie die Viabilität der Zellen beurteilt werden.

Bei der Wahl des Transfektionsverfahrens wurde die Nukleofektion gewählt, eine Sonderform der Elektroporation. Diese weist eine hohe Transfektionseffizienz von bis zu 90% auf (Gresch *et al.* 2004). Damit wird die Zahl der zu transfizierenden Zellen und somit auch die Menge des zu verwendenden Materials reduziert und die Sensitivität der Detektion durch eine weiter erhöhte Signalintensität verbessert (Hamm *et al.* 2002).

Die Verwendung von vier Varianten pro Protein steigert die Zahl der zu untersuchenden Interaktionen erheblich. Somit ist eine Reduktion der Messzeit wichtig. Diese konnte durch Optimierung der Substratinjektion und eine Halbierung der Detektionsdauer pro Well erzielt werden, ohne dass hierdurch die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigt wurde. Diese Maßnahme hat auch das Potenzial, während der Detektion negative Einflüsse auf die Zellen zu vermindern und damit ihre Viabilität und das intrazelluläre Milieu zu stabilisieren.

Durch Verwendung des Substrates ViviRenTM (Promega) werden die Messungen nur in lebenden Zellen durchgeführt. Bei ViviRenTM muss in der Zelle zunächst eine Esterbindung gespalten werden, bevor es von der Luziferase umgesetzt werden kann. Dieser Prozess erfolgt nur in lebenden Zellen. Dadurch werden lediglich PPI in lebenden Zellen detektiert, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, nur biologisch relevante Interaktionen zu erfassen. Eine Beeinflussung dieser durch Proteinextraktion oder gar Denaturierung der Proteine kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Bei anderen *in vivo*-Verfahren kann es z.B. auf der Grundlage methodischer Erfordernisse oder Folgen zu einer Fehllokalisation von Proteinen kommen, was die Qualität der Ergebnisse beeinflussen kann. Bei Y2H müssen die Fusionsproteine in den Nukleus translozieren, um eine PPI sichtbar werden zu lassen. Damit kommt es v.a. bei Membranproteinen zu einer reduzierten *coverage* (Miller *et al.* 2005). Dieser Effekt kann bei dem hier beschriebenen Verfahren vermieden werden, da die untersuchten Proteine in vitalen Zellen am Ort ihrer natürlichen Expression und Lokalisation untersucht werden.

Um die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu reduzieren und damit eine bessere *accuracy* zu erzielen, wurde mittels biomathematischer Verfahren ein Schwellenwert für positive Interaktionen bestimmt. Mit dem Begriff *accuracy* wird der Anteil der richtig-positiven PPI erfasst, somit also die Spezifität der Methode (von Mering *et al.* 2002). In Fällen, in welchen BRET-Signale keine sichere Zuordnung hinsichtlich positiver oder negativer Interaktion zulassen, da sie in einem Graubereich nahe an diesem Schwellenwert liegen (BRET-Ratio = $0,035 \pm 0,018$), wird die Ratio von Donor und Akzeptor zugunsten des Akzeptors variiert und Sättigungskurven erstellt. Diese zeigen bei positiven Interaktionen einen hyperbolischen Verlauf, welcher sich bei Sättigung aller

DISKUSSION

Donorproteine mit Akzeptor einem Plateau annähert. Bei negativen PPI findet sich jedoch ein linearer Verlauf, welcher auf zufällige Interaktionsereignisse hinweist und über einen großen Bereich der Zahl von Donor- und Akzeptor-Molekülen keine Sättigung aufweist (Mercier *et al.* 2002; Hamdan *et al.* 2006; James *et al.* 2006).

4.2. Evaluierung der Methode durch Bestätigung positiver und negativer PPI

Durch Anwendung des entwickelten iBRET-Verfahrens an drei bekannten positiven PPI und einer bekannten negativen PPI wurde dieses evaluiert. Dabei wurden einzelne Aspekte näher beleuchtet.

ADRB2, der adrenerge β_2 -Rezeptor, ist ein G-Protein-gekoppelter Membranrezeptor, dessen Defekte mit Asthma, Adipositas und Typ 2-Diabetes vergesellschaftet sind. Es ist bekannt, dass dieser neben Bindung zahlreicher anderer Proteine auch konstitutive Homodimere in der Zellmembran bildet (Angers *et al.* 2000; McVey *et al.* 2001). Die ADRB2-Homodimerisierung wurde von Angers *et al.* als eine der ersten Interaktionen mittels BRET nachgewiesen und von McVey durch FRET- und BRET-basierte Verfahren bestätigt. Dabei untersuchten Angers *et al.* und McVey *et al.* die Dimerisierung nur an C-terminal markierten ADRB2-Proteinen.

In unseren Experimenten konnten wir diese Interaktion ebenfalls nachweisen, wobei sich der größte Energietransfer bei N-terminal gelegenen *tags* fand. Anhand einer Sättigungskurve für diese beiden Interaktionspartner (hRluc-ADRB2 und Venus-ADRB2) bestätigten wir die Homodimerisierung. Die Messungen mit C-terminalen Reportern erbrachte in unseren Experimenten den geringsten RET und musste als negativ gewertet werden, da die Werte unterhalb des Schwellenwertes für positive Interaktionen lagen. Dies zeigt eindrücklich den Einfluss der Proteinstruktur auf die PPI und weist auf die Bedeutung der Untersuchung aller *tag*-Orientierungen hin. Da sich die verwendeten Konstrukte in dieser Arbeit von den in den beiden anderen Arbeiten im Wesentlichen durch die Sequenz (*linker*) zwischen ADRB2 und dem jeweiligen Reporter unterscheiden, welche neben anderen AS-Sequenzen auch *attB-sites* enthalten, muss davon ausgegangen werden, dass dieser *linker* Einfluss auf die Orientierung der *tags* zum jeweiligen Protein und auf die Struktur des gesamten Fusionsproteins hat. Damit wird die Orientierung der *tags* zueinander und infolgedessen der RET beeinflusst. Durch eine Modifikation dieser zwischengeschalteten Sequenz, beispielsweise durch Einführung eines sog. *Huston linkers*, könnte dieser Einfluss ggf. reduziert werden. Dabei handelt es sich um ein 15 AS langes, aus den AS Glycin (Gly) und Serin (Ser) bestehendes Oligopeptid (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃, das eine nur geringfügige Neigung zur Bildung einer geordneten Sekundärstruktur hat und damit sehr flexibel ist (Huston *et al.* 1988). Dies wird im Rahmen eines weiteren Promotionsprojektes untersucht.

Die Peroxine PEX3 und PEX19 sind an der frühen Biogenese von Peroxisomen beteiligt (Suzuki *et al.* 2001). PEX3 ist ein integrales Membranprotein, welches als *docking factor* für das lösliche Protein PEX19 fungiert. Es ist über 34 N-terminal gelegene AS in der peroxisomalen Membran

DISKUSSION

verankert (Kammerer *et al.* 1998; Soukupova *et al.* 1999). Die Interaktion dieser zwei Peroxine wurde inzwischen mehrfach gezeigt und findet zu etwa 95% an der peroxisomalen Membran und zu ca. 5% im Zytoplasma statt (Snyder *et al.* 1999; Sacksteder *et al.* 2000; Muntau *et al.* 2003; Jones *et al.* 2004). Ebenso wurden die Interaktionsdomänen näher charakterisiert. Dabei sind die N-terminalen 44 AS von PEX19 und drei Regionen in PEX3, die über den zytoplasmatisch gelegenen Anteil des Proteins verstreut liegen, als Interaktionsdomänen identifiziert worden (Sato *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2012). PEX3 bildet in seinem zytoplasmatischen Anteil ein Bündel von sechs α -Helices, wobei die Bereiche um die AS 100, 200 und 320 eine entscheidende Rolle für die Bindung mit PEX19 spielen (Sato *et al.* 2010). Diese liegen im reifen Protein in maximaler Entfernung zur peroxisomalen Membran (Schmidt *et al.* 2012) im Bereich des C-Terminus von PEX3.

Bei den in dieser Arbeit ausgeführten BRET-Messungen fällt auf, dass für drei von acht möglichen *tag*-Orientierungen eine positive Interaktion messbar ist (Abbildung 31). Dabei liegt bei allen drei PEX3-Fusionsproteinen der *tag* N-terminal in der Matrix des Peroxisoms, bei PEX19 zweimal C-terminal und einmal N-terminal. Dies weist darauf hin, dass C-terminales *tagging* von PEX3 in dem hier vorgestellten System zu einer Verhinderung der PPI oder zumindest des RET führt. Bei PEX19 wiederum stört die Orientierung des Reporters die PPI nicht erheblich. Lediglich bei der Kombination hRluc-PEX19 mit Venus-PEX3 kommt es nicht zu einem messbaren RET über die peroxisomale Membran. Bei der analogen Kombination hRluc-PEX3 mit Venus-PEX19 kommt es zu einem nur knapp über dem Schwellenwert liegenden Energietransfer. Bei Austausch der Reporter könnte dieses zuvor gerade noch messbare Signal durch eine leichte sterische Veränderung der Reporter zueinander verhindert werden.

ABCD1 ist ein peroxisomaler ABC-Transporter, der am Import von VLCFA und deren Koenzym-A-Ester in die peroxisomale Matrix beteiligt ist (Wanders *et al.* 2007). Er ist mit seinem N-terminalen Anteil in der Membran des Peroxisoms verankert, wobei der C-Terminus ins Zytoplasma ragt (Contreras *et al.* 1996). Die Homodimerisierung wird über eine große Region im Bereich der C-terminalen Proteinhälfte vermittelt (AS 361-745) (Liu, L. X. *et al.* 1999). Bei der BRET-Messung haben wir bei zwei der vier möglichen Kombinationen positive PPI-Signale detektiert (Abbildung 32). Dabei befanden sich die *tags* bei dem höchsten gemessenen RET jeweils am C-Terminus der Fusionsproteine. Es ließ sich jedoch auch bei der Kombination von ALD-hRluc mit Venus-ALD ein Energietransfer oberhalb des Schwellenwertes für positive Interaktionen über die peroxisomale Membran hinweg detektieren. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass der Energietransfer bei interagierenden Membranproteinen auch über die Membran gemessen werden kann.

CD2 ist ein T-Zell-Antigen, das mit seinem C-Terminus in der Zellmembran verankert ist und dessen N-Terminus in den extrazellulären Raum ragt (Sewell *et al.* 1986). Es geht eine Bindung mit CD58 ein. Eine Homodimerisierung von CD2 ist jedoch nicht bekannt. Wir haben bei den durchgeführten BRET-Messungen einen potentiellen Energietransfer bei C-terminal gelegenen *tags* (CD2-hRluc & CD2-Venus) detektiert und diesen anhand einer Sättigungskurve weiter untersucht. Dabei zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der BRET-Ratio und der Akzeptor/Donor-Ratio, was das Fehlen einer PPI stützt.

DISKUSSION

4.3. Homodimerisierung von PEX26

Defekte von PEX26 verursachen etwa 3% der Defekte der peroxisomalen Biogenese (Ebberink *et al.* 2011). Derzeit ist verhältnismäßig wenig über Struktur und Funktion dieses Proteins bekannt: es wird davon ausgegangen, dass es sich um den Anker für den PEX1/PEX6-Komplex in der peroxisomalen Membran handelt. Dort ist es am Import von Matrixproteinen bzw. dem Recycling des Cargo-Transporters PEX5 beteiligt (Matsumoto *et al.* 2003a; Weller *et al.* 2005; Furuki *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir erstmalig *in vivo* die Homodimerisierung von PEX26 beobachtet. Diese zeigt bei N-terminal bzw. im Zytoplasma gelegenen Reporterproteinen den höchsten Energietransfer. Das könnte darauf hinweisen, dass die N-Termini der interagierenden Proteine besonders eng aneinander liegen. In diesem Teil des Proteins (AS 29-174) befindet sich die Interaktionsdomäne mit dem PEX1/PEX6-Komplex (Weller *et al.* 2005).

Die Oligomerisierungsdomäne konnte auf den C-terminalen Abschnitt von PEX26 eingegrenzt werden. Dabei sind die AS 175-305 entscheidend, wobei es vermutlich zwei wichtige Bindungsdomänen gibt, die unabhängig voneinander funktionieren: eine befindet sich im Bereich N-terminal der TMD (AS 175-251) und eine weitere im C-terminal in der peroxisomalen Matrix gelegenen Bereich des Proteins (AS 270-305). Diese Domänen zeigen zum Teil eine Überlappung zu den PEX19-Bindestellen in PEX26, welche sich im Bereich der AS 251-269 und AS 277-297 befinden (Halbach *et al.* 2006). Somit liegen in PEX26 die Homodimerisierungsdomäne und die PEX19-Bindungsdomäne getrennt von der PEX6-Bindungsdomäne vor.

Wir haben gezeigt, dass die Akzeptor-Proteine von PEX26, Venus-PEX26 und PEX26-Venus am Peroxisom lokalisiert sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Fusionsproteine ihre biologischen Aufgaben erfüllen können. Die Lokalisation der Donor-Proteine wurde in Ermangelung geeigneter Antikörper gegen PEX26 oder hRluc nicht untersucht. Eine Zelllinie mit PEX26-Defekt lag uns nicht vor, wodurch die Untersuchung der Expressionskonstrukte hinsichtlich ihrer Komplementationfähigkeit verhindert wurde.

4.4. Dimerisierung von PEX26 Δ ex5

Neben PEX26 existiert eine im ER und Zytoplasma lokalisierte Splice-Variante PEX26 Δ ex5, bei welcher die AS 224 bis 269 und somit das Exon 5 fehlen (Weller *et al.* 2005). Dieser Abschnitt des Proteins beinhaltet die TMD bzw. einen Teil der ersten von zwei Oligomerisierungsdomänen. Die Interaktionsexperimente zeigten bei der Homodimerisierung der Splice-Variante höhere Werte für den Energietransfer. Auch ist die Bevorzugung der N-terminalen *tags* hinsichtlich des Energietransfers nicht so deutlich wie bei PEX26fl. Dies weist auf eine deutlich veränderte Orientierung von hRluc und Venus bei der Homodimerisierung von PEX26 Δ ex5 und damit auf eine andere Struktur dieses Proteins verglichen mit PEX26fl hin. Als Interaktionsdomäne von PEX26 Δ ex5 wurden die AS 270-305 – wie aus den Untersuchungen an PEX26fl und der Struktur

DISKUSSION

der Splice-Variante erwartet – bestätigt. Jedoch konnte auch die Region der AS 175-223 als Oligomerisierungsdomäne identifiziert werden, da PEX26 Δ ex5 mit dem Fragment 175-251 interagiert.

Daneben stellten wir fest, dass PEX26 Δ ex5 neben Homodimeren auch Dimere mit PEX26fl bildet. Dies lässt den Rückschluss zu, dass möglicherweise Dimere oder Oligomere unterschiedlicher Zusammensetzung aus PEX26 und der Splice-Variante mit verschiedenen funktionellen Eigenschaften existieren. Diese könnten bei der Regulation komplexer Proteinfunktionen bedeutsam sein (Hashimoto und Panchenko 2010).

4.5. Bedeutung der PEX26-Homodimerisierung

Da PPI grundsätzlich eine biologische Funktion erfüllen, ist davon auszugehen, dass auch die Homodimerisierung von PEX26 eine Rolle bei dessen Aufgaben spielt (Hashimoto und Panchenko 2010). Homodimerisierungen können die Stabilität und Zusammensetzung von Proteinkomplexen beispielsweise durch Bildung neuer Bindungsstellen beeinflussen (Ispolatov *et al.* 2005).

Bei PEX26-defizienten Zelllinien kann der Defekt durch Transfektion mit der Splice-Variante PEX26 Δ ex5 weitgehend komplementiert werden (Matsumoto *et al.* 2003a; Weller *et al.* 2005). In vier unterschiedlichen Defektzelllinien konnten Komplementationsraten von 84% bis 106% bezogen auf den Katalase-Import erzielt werden (Weller *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde auch das kleinste Fragment ermittelt, welches für die Komplementation erforderlich ist. Dabei wurde festgestellt, dass die PEX6-Bindedomäne für gut 50% dieses Effektes verantwortlich ist. Die Verankerung in die Membran scheint jedoch für die Funktion von PEX26 bedeutsam zu sein. Es wurde in dieser Arbeit ein chimäres Protein, bestehend aus den ersten 222 AS von PEX26 und dem für den Einbau in die äußere mitochondriale Membran notwendigen C-terminalen Anteil des mitochondrialen Proteins OMP25 aus der Ratte, erstellt (PEX26-Mito). Dieses Protein wird in die mitochondriale Membran eingebaut und erzielt eine Komplementationsrate von über 80%.

Dies könnte darauf hinweisen, dass PEX26 neben seiner Funktion als PEX1/PEX6-Anker in der peroxisomalen Membran weitere Aufgaben erfüllt. Gestützt wird diese Hypothese durch die Lokalisation der Splice-Variante PEX26 Δ ex5 im ER. Inzwischen ist bekannt, dass die *de novo*-Synthese von Peroxisomen vom ER ausgeht (Kunau und Erdmann 1998; Titorenko und Rachubinski 1998; Hoepfner *et al.* 2005; Toro *et al.* 2007). Damit könnte PEX26 neben seiner Rolle beim Matrixproteinimport auch eine Rolle bei der Homöostase und Differenzierung der Peroxisomen spielen, wobei die Splice-Variante die peroxisomale Proliferation einleiten könnte. Einen Hinweis darauf liefert ein Befund bei dem Pilz *Neurospora crassa* (Liu, F. *et al.* 2011): Woronin-Körperchen sind eine besondere Form von Peroxisomen in Pilzen und spielen bei der Versiegelung von Zellkontakten bei Verletzung von Hyphen eine wichtige Rolle. In diesen bildet das *Woronin body major protein* HEX den kristallinen Kern des Organells. HEX bindet PEX26, was zu einer Anreicherung von PEX26 in den entsprechenden Membranabschnitten und einer

DISKUSSION

Differenzierung dieser zum Woronin-Körperchen führt. Dies geschieht durch PEX26-vermittelten Import weiterer HEX-Proteine und anderer Matrix-Proteine. Bei PEX26-Defekten werden äußerst kleine Woronin-Körperchen gebildet.

Das Modell der Initiierung der Peroxisomen-Differenzierung durch PEX26 und PEX26 Δ ex5 am ER vermag zwar die Entstehung von peroxisomalen *ghosts* in PEX26-defizienten Zellen durch die nicht am Peroxisom gelegene Splice-Variante zu erklären. Jedoch ist damit die Wiederherstellung der Funktion von PEX26 beim Matrixproteinimport an der peroxisomalen Membran nicht hinreichend erklärt. Eine dazu aufgestellte Hypothese ist, dass PEX1 durch Bindung an den PEX6/PEX26-Komplex aktiviert wird und seine Aufgaben beim Matrix-Protein-Import erfüllt (Weller *et al.* 2005). Gestützt wird diese Annahme durch die in der genannten Arbeit beschriebene ausschließliche Lokalisation von PEX26-Mito und PEX6 am Mitochondrium, wohingegen PEX1 auch am Peroxisom nachgewiesen werden kann.

Alternativ bleibt das Modell, welches zusätzliche Aufgaben für PEX26 und andere Peroxine postuliert, bestehen. Dieses findet weitere Unterstützung aufgrund einer Arbeit, in deren Rahmen 613 Zelllinien von Patienten untersucht wurden, die an Defekten aus dem Zellweger-Spektrum erkrankt waren (Ebberink *et al.* 2011). Hier konnte keine neue Komplementationsgruppe gefunden werden. Jedoch sind in der Hefe 28 Peroxine, beim Menschen allerdings nur 14 Peroxine bekannt (Schluter *et al.* 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass humane Peroxine Aufgaben übernommen haben, für die es bei der Hefe jeweils eigene Peroxine gibt (Kunau 1998). Pex4p beispielsweise existiert nur in der Hefe, nicht beim Menschen. Es ist dort am Import von Matrixproteinen beteiligt – speziell an der Ubiquitinierung von Pex5p, dem Kargo-Transporter für PTS1-Matrixproteine (Eckert und Johnsson 2003). Diese Aufgabe erfüllt Pex4p gemeinsam mit Pex22p. Beide Peroxine bilden eine funktionelle Einheit zum Rezeptor-Recycling mit dem RING-Finger-Komplex bestehend aus PEX2, PEX10 und PEX12 und den AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 (Platta *et al.* 2004). Es wurde beschrieben, dass die Eigenschaften von Pex22p bei der Pex5p-Ubiquitinierung durch den N-terminalen Anteil von PEX3 funktionell ersetzt werden können (Halbach *et al.* 2009). An dieser Stelle hat PEX3 beim Menschen möglicherweise Aufgaben übernommen, die in der Hefe von Pex4p und Pex22p verrichtet werden. Ein weiteres Beispiel stellt Pex17p dar, welches bei der Hefe Teil des *docking complex* ist. Beim Menschen besteht dieser Komplex lediglich aus PEX13 und PEX14. Die Aufgaben von Pex17p wurden beim Menschen offenbar von diesen beiden Peroxinen übernommen (Agne *et al.* 2003). Pex18p und Pex21p sind in der Hefe Co-Rezeptoren für Pex7p (Purdue *et al.* 1998). Sie werden dort beim Import von PTS2-Matrixproteinen benötigt, wobei Pex21p mit Pex7p interagiert. Beim Menschen interagiert PEX7 beim PTS2-Import mit PEX5L. Die Aufgaben von Pex18p und Pex21p wurden beim Menschen scheinbar von PEX5 übernommen (Otera *et al.* 2000; Lanyon-Hogg *et al.* 2010). Da beim Menschen eine erheblich geringere Zahl von Peroxinen gefunden wird, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass diese jeweils komplexere Aufgaben haben als dies bei ihren Homologen in anderen Spezies der Fall ist.

Es konnte bislang nicht geklärt werden, welche Bedeutung die PEX26-Dimerisierung für die PEX6-Bindung hat, jedoch ist bekannt, dass Homodimere gewöhnlich doppelt so viele

DISKUSSION

Interaktionspartner haben als nicht dimerisierende Proteine (Ispolatov *et al.* 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass PEX26 neben den hier beschriebenen Interaktionspartnern – PEX6, PEX19 und sich selbst – weitere Bindungspartner hat. In der Literatur ist ein Interaktionspartner von PEX26 beschrieben, der Hinweise auf derzeit unbekannte Funktionen geben könnte. SUFU (*suppressor of fused*) wurde per Y2H als Interaktionspartner entdeckt (Rual *et al.* 2005). Es handelt sich dabei um ein in Nukleus und Zytoplasma lokalisiertes 54 kDa großes Protein, das Bestandteil des *Sonic hedgehog signalling pathway* (SHH) ist. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der frühen Zell- und Gewebeentwicklung. SUFU hemmt dabei den SHH. Bei SUFU-Defekten kommt es zu Fehlbildungen (Grimm *et al.* 2001) oder zu einer erhöhten Inzidenz von Tumoren wie dem Medulloblastom (Taylor *et al.* 2002). Dies könnte darauf hinweisen, dass PEX26-Defekte nicht allein durch Störung der Peroxisomen-Funktion, sondern auch aufgrund einer ausbleibenden PPI mit SUFU durch eine Fehlsteuerung in der Embryogenese zu Fehlbildungen führen.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist Pex15p das homologe Peroxin zu PEX26. Obwohl beide Proteine offenbar die gleichen Funktionen ausüben, sind die Übereinstimmungen der Sequenzen beider Proteine jedoch gering (Halbach *et al.* 2006). Bei einem BLAST-Abgleich (*Basic Local Alignment Search Tool*) der Aminosäuresequenzen findet sich lediglich in einem begrenzten Abschnitt der PEX6-Bindedomäne (AS 128-197 in Pex15p bzw. AS 40-100 in PEX26) eine Übereinstimmung von 27%.

Auch für Pex15p ist die PPI mit Pex6p an der peroxisomalen Membran beschrieben (Birschmann *et al.* 2003). Eine Pex15p-Homodimerisierung wurde bislang nicht beschrieben, es sind jedoch weitere Interaktionspartner bekannt. Mehrere wurden mittels TAP identifiziert, was jedoch keinen Rückschluss auf eine direkte Interaktion zulässt, da mit dieser Methode Bindungspartner des gesamten Pex1p/Pex6p/Pex15p-Komplexes identifiziert wurden. Dies waren v.a. die Proteine des Importomers: das RING-Finger-Peroxin Pex10p, die Komponenten des *docking complex* Pex13p, Pex14p und Pex17p sowie Pex8p und Pex5p (Birschmann *et al.* 2003). Auch ein Komplex mit dem RING-Finger-Protein Pex2p wurde mittels Affinitätsreinigung gefunden (Platta *et al.* 2009).

In einem *split ubiquitin assay* wurde gezeigt, dass neben den bekannten Bindungspartnern des *docking complex* und des RING-Finger-Komplexes auch Pex3p und Pex22p eine schwache Interaktion mit Pex15p eingehen (Eckert und Johnsson 2003). Diese beiden Interaktionen könnten jedoch durch Pex19p beim Import von Pex15p in die peroxisomale Membran vermittelt sein.

Mittels Y2H wurde GET3 (*guanine nucleotide exchange factor*) als Interaktionspartner von Pex15p entdeckt (Schuldiner *et al.* 2008). Dabei handelt es sich um eine Untereinheit des GET-Komplexes, welcher an dem Protein-Transport vom Golgi-Apparat zum ER und der Insertion von Proteinen in die ER-Membran beteiligt ist. In Abwesenheit von GET3 wird PEX15p ins Mitochondrium fehllokalisiert. Das humane Homologe für GET3 ist ASNA1 bzw. TRC40, das die TMD von *tail-anchored* Proteinen im Zytoplasma erkennt, diese bindet und sie zum ER transportiert, wo sie in die Membran eingebaut werden. Für PEX26 konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass es nicht auf diesen Transporter angewiesen ist, sondern allein durch PEX19 zum Peroxisom transportiert wird (Yagita *et al.* 2013).

DISKUSSION

Aus dem Bereich der Protein-Regulation sind zwei Interaktionspartner von Pex15p bzw. seiner mRNA bekannt: UBI4, die Ubiquitin-Variante 4, konnte mittels Affinitätsreinigung an Pex15p gefunden werden (Kolawa *et al.* 2013). Ein Homologes zu diesem Gen existiert beim Menschen nicht. Vermutlich ist die Ubiquitinierung von Pex15p für seinen Abbau bedeutsam. NAB2, ein RNA-Bindeprotein, bindet die mRNA von Pex15 zum Transport aus dem Zellkern (Batisse *et al.* 2009). Darüber wird das mRNA-Niveau von Zellen reguliert. Beim Menschen existieren hnRNPs als Homologe zu diesem Protein.

Ein durch Affinitätsreinigung entdeckter Interaktionspartner von Pex15p ist RAD2, eine Einzelstrang-DNA-Endonuklease, welche an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Ho *et al.* 2002). Das homologe Protein beim Menschen ist XPG, das durch das *ERCC5*-Gen kodiert wird. Bei dessen Defekten kommt es zu Xeroderma pigmentosum oder zum Cockayne-Syndrom, das durch Wachstumsstörung, mentale Retardierung und Kachexie gekennzeichnet ist. Die biologische Bedeutung dieser Interaktion erscheint jedoch fraglich, da XPG im Nukleus lokalisiert ist (Aracil *et al.* 2013).

Auf Proteinebene wurden weitere Interaktionspartner von Pex15p beschrieben, für die es beim Menschen allerdings keine Homologe gibt: In einer *split ubiquitin*-Untersuchung wurden FET5 und STE3 als Interaktionspartner von Pex15p entdeckt (Miller *et al.* 2005). Bei FET5 handelt es sich um eine in der Vakuolen-Membran lokalisierte Kupfer-Oxidase, die am Eisentransport beteiligt ist. STE3 ist ein G-Protein, welches als Pheromon-Rezeptor in der Zellmembran bei der Reifung der Hefezellen agiert. Mittels Affinitätsreinigung wurden die beiden Proteine SSA1 und SSA2 als Interaktionspartner von Pex15p identifiziert (Babu *et al.* 2012). Dabei handelt es sich um zwei Chaperone aus der HSP70-Familie (*heat shock protein*), welche sich in der Zellwand, dem Zytoplasma und Vakuolen befinden. Bei Säugetieren sind lediglich in der Ratte homologe Proteine beschrieben.

Neben diesen Interaktionen auf Proteinebene wurden auch genetische Interaktionen gefunden. Mittels *synthetic growth defect* wurden vier Gene entdeckt, die gemeinsam mit Pex15 einen erheblichen Einfluss auf das Zellwachstum haben. Dabei handelt es sich bei EST1 um einen Faktor, der bei der Telomer-Elongation von Bedeutung ist (Chang *et al.* 2011). LAS21 ist ein integrales Membranprotein, welches an der Synthese von Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankern beteiligt ist (Tong *et al.* 2004). NPT1 ist eine im Zellkern gelegene Nikotinat-Phosphoribosyltransferase, die bei der Biosynthese von NAD⁺ und beim *silencing* von Telomeren agiert (Pan *et al.* 2006). YUR1 ist eine im Golgi-Apparat gelegene Mannosyl-Transferase, die bei der N-Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist (Tong *et al.* 2004). Für LAS21 ist das humane Homologe PIGG bekannt (Shishioh *et al.* 2005). Dieses wandelt das GPI H7 durch Bindung einer Ethanolaminphosphat-Gruppe an einen Mannose-Rest zu H8 um. Dieser Vorgang läuft im ER ab und der fertige GPI-Rest wird anschließend als posttranslationale Modifikation an den C-Terminus von Proteinen gekoppelt. Für PEX26 gibt es keine Hinweise auf eine derartige Modifikation.

Auch mit genetischen Verfahren konnten weitere Interaktionspartner von Pex15 gefunden werden, für welche es beim Menschen keine homologen Proteine gibt. HDA1 ist Bestandteil des Klasse II Histon-Deacetylase-Komplexes, in welchem es als Hetero-Tetramer mit Hda2p und Hda3p

DISKUSSION

fungiert (Kaluarachchi Duffy *et al.* 2012). Es ist an der Regulation der Transkription von genetischer Information und somit auch an der Kontrolle des Zellzyklus und der Entwicklung beteiligt. Defekte von HDA1 führen zu gesteigerter Acetylierung der Histone H2B, H3 und H4. Mittels *dosage lethality* konnte eine funktionelle Interaktion mit Pex15p festgestellt werden. Mit dieser Methode wurde auch SRS2, eine an der DNA-Reparatur beteiligte DNA-Helikase als Interaktionspartner von Pex15p entdeckt (Leon Ortiz *et al.* 2011). APL4, eine Untereinheit des *clathrin-associated protein complex*, welcher am Vesikel-Transport beteiligt ist, wurde mittels genetischer Interaktion als Interaktionspartner von Pex15p identifiziert (Costanzo *et al.* 2010). Mittels *synthetic rescue* wurden zwei funktionelle Interaktionspartner von Pex15p gefunden. CDC13 ist an der Regulation der Telomer-Replikation beteiligt (Addinall *et al.* 2008). NPL3 ist ein RNA-bindendes Protein, das an der mRNA-Elongation, dem *splicing* von pre-mRNA und dem mRNA-Transport aus dem Zellkern beteiligt ist (Moehle *et al.* 2012). Diese Interaktionspartner scheinen in der Hefe mit der Regulation der Pex15p-Expression und weniger mit seinen eigenen Funktionen in Verbindung zu stehen.

4.6. Ausblick zur Bedeutung der PEX26-Dimerisierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir anhand eines neu entwickelten Hochdurchsatz-Verfahrens zur Detektion von PPI erstmalig zeigen, dass PEX26 Homodimere bildet. Zudem bildet auch seine Splice-Variante PEX26 Δ ex5 Homodimere und heterodimerisiert mit PEX26fl. Aufgrund der bislang bekannten Interaktionspartner von PEX26 bzw. Pex15p aus der Hefe konnten keine Rückschlüsse auf weitere Funktionen von PEX26 – insbesondere auf die Bedeutung der Homodimerisierung – gezogen werden. Möglicherweise spielt sie jedoch eine Rolle bei der Regulation der peroxisomalen Biogenese und Teilung. Dies belegt die Notwendigkeit für *in vivo*-Untersuchungen von PPI im Hochdurchsatz zur Klärung der offenen Fragen. In der Arbeitsgruppe erfolgt derzeit die Kartierung des gesamten peroxisomalen Interaktoms mittels iBRET. Es ist zu erwarten, dass hierbei weitere Interaktionspartner von PEX26 identifiziert werden.

Aktuell sind über 20 PEX26-Mutationen bekannt, wobei keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht (Ebberink *et al.* 2011). Interessanterweise können Mutationen im PEX26-Gen sämtliche klinische Schweregrade des Zellweger-Spektrums verursachen. Auch ist nicht bekannt, wie die PEX26-Funktion beim Import von Matrixproteinen die Variabilität bei der Manifestation der Erkrankungen verursacht. Auf der Grundlage des bekannten peroxisomalen Interaktoms könnten in der Folge die Interaktionsnetzwerke der varianten PEX26-Proteine untersucht werden, da zu erwarten ist, dass durch die verschiedenen Mutationen unterschiedliche Interaktionen zerstört werden – mit unterschiedlichen Folgen auf die phänotypische Ausprägung.

Darüber hinaus könnte mittels BRET-Analysen an PEX26-Konstrukten mit modifizierten Bindungsdomänen die Bedeutung der Dimerisierung eruiert werden. Auch könnten anhand metabolischer Untersuchungen der Einfluss derartiger Konstrukte auf die Funktion der Peroxisomen beispielsweise anhand des VLCFA-Abbaus oder der Katalase-Funktion untersucht

DISKUSSION

werden. Für ein genaueres Verständnis der PEX26-Struktur und der Dimerisierung könnten schließlich *in silico*-Untersuchungen bzw. die Kristallisation von großem Nutzen sein.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Anzahl bekannter und zu erwartenden PPI beim Menschen | 2 |
| Abbildung 2: Spektrale Überlappung von Donor und Akzeptor | 3 |
| Abbildung 3: Donor-Akzeptor-Abstand und Effizienz des Energietransfers..... | 4 |
| Abbildung 4: Resonanzenergietransfer nach Jablonski | 4 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des BRET | 6 |
| Abbildung 6: Prinzip der Tandem Affinitätsreinigung (TAP)..... | 9 |
| Abbildung 7: Qualität der Daten bei Interaktionsstudien in Abhängigkeit von der Methode | 12 |
| Abbildung 8: Importmechanismus für peroxisomale Matrixproteine mit der PTS1-Targeting-Sequenz | 16 |
| Abbildung 9: Vergleich der Signalintensitäten von hRluc und Rluc | 41 |
| Abbildung 10: Vektorkarte von N-hRluc-DEST | 42 |
| Abbildung 11: Vektorkarte von C-hRluc-DEST | 43 |
| Abbildung 12: Vektorkarte von pVenus-N1 | 44 |
| Abbildung 13: Expression von pEYFP-N1 (links) und pVenus-N1 (rechts) in COS-7-Zellen..... | 45 |
| Abbildung 14: Vektorkarte von N-Venus-DEST | 45 |
| Abbildung 15: Vektorkarte von C-Venus-DEST | 46 |
| Abbildung 16: BP-Reaktion | 47 |
| Abbildung 17: LR-Reaktion | 48 |
| Abbildung 18: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von Nukleofektionsprogramm und DNA-Menge | 52 |
| Abbildung 19: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von transfizierter Zellzahl und Übertrag zur Kultivierung..... | 53 |
| Abbildung 20: Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration..... | 54 |
| Abbildung 21: Signale von Venus-hRluc im Luziferase- und BRET-Kanal über 180 s am LUMIstar Optima..... | 56 |
| Abbildung 22: Graphische Darstellung des LUMIstar Optima Messprotokolls | 57 |
| Abbildung 23: Luziferase- und BRET-Signale von Venus-hRluc über 15 Minuten | 58 |
| Abbildung 24: Spektrophotometrische Bestimmung des Energietransfers der BRET-Positivkontrollen im Vergleich zu N-hRluc-DEST | 59 |
| Abbildung 25: Darstellung der Dichtefunktionen für positive (grün) und negative (rot) BRET-Ratios... | 60 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 26: Schematische Darstellung der vier möglichen Varianten eines Fusionsproteins in iBRET | 61 |
| Abbildung 27: Schematische Darstellung der vier möglichen Interaktionen bei Untersuchung einer Homodimerisierung | 61 |
| Abbildung 28: Schematische Darstellung der acht möglichen Interaktionen bei Untersuchung einer Heterodimerisierung | 62 |
| Abbildung 29: Homodimerisierung von ADRB2 | 64 |
| Abbildung 30: Homodimerisierung von CD2 | 65 |
| Abbildung 31: Heterodimerisierung von PEX3 und PEX19 | 67 |
| Abbildung 32: Homodimerisierung von ABCD1 | 68 |
| Abbildung 33: Homodimerisierung von PEX26 | 69 |
| Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der zellulären Lokalisation von Venus-PEX26 und PEX26-Venus | 70 |
| Abbildung 35: Eingrenzung der Interaktionsdomäne für die PEX26-Homodimerisierung | 71 |
| Abbildung 36: Schematische Darstellung von PEX26 Δ ex5 und PEX26fl | 72 |
| Abbildung 37: Interaktionsexperimente der Splice-Variante PEX26 Δ ex5 | 75 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Enzymausstattung des Gateway [®] -Systems | 47 |
| Tabelle 2: <i>att-sites</i> im Gateway [®] -System | 47 |

Literaturverzeichnis

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., et al. (2000).** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287(5461): 2185-2195.
- Addinall, S.G., Downey, M., Yu, M., Zubko, M.K., Dewar, J., Leake, A., et al. (2008).** A genomewide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180(4): 2251-2266.
- Agne, B., Meindl, N.M., Niederhoff, K., Einwachter, H., Rehling, P., Sickmann, A., et al. (2003).** Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* 11(3): 635-646.
- Ahn, S.M., Kim, T.H., Lee, S., Kim, D., Ghang, H., Kim, D.S., et al. (2009).** The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. *Genome Res* 19(9): 1622-1629.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilalret, S., Chelsky, D., Dennis, M., et al. (2000).** Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3684-3689.
- Aracil, M., Dauffenbach, L.M., Diez, M.M., Richeh, R., Moneo, V., Leal, J.F., et al. (2013).** Expression of XPG protein in human normal and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 6(2): 199-211.
- Ashley, E.A., Butte, A.J., Wheeler, M.T., Chen, R., Klein, T.E., Dewey, F.E., et al. (2010).** Clinical assessment incorporating a personal genome. *Lancet* 375(9725): 1525-1535.
- Avery, O.T., Macleod, C.M. und McCarty, M. (1944).** Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type Iii. *J Exp Med* 79(2): 137-158.
- Ayoub, M.A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., et al. (2002).** Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277(24): 21522-21528.
- Ayoub, M.A. und Pfleger, K.D. (2010).** Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. *Curr Opin Pharmacol* 10(1): 44-52.
- Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B.D., et al. (2012).** Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 489(7417): 585-589.
- Baker, M. (2012).** Proteomics: The interaction map. *Nature* 484(7393): 271-275.
- Barkovich, A.J. und Peck, W.W. (1997).** MR of Zellweger syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol* 18(6): 1163-1170.
- Batisse, J., Batisse, C., Budd, A., Bottcher, B. und Hurt, E. (2009).** Purification of nuclear poly(A)-binding protein Nab2 reveals association with the yeast transcriptome and a messenger ribonucleoprotein core structure. *J Biol Chem* 284(50): 34911-34917.
- Birschmann, I., Stroobants, A.K., van den Berg, M., Schafer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W.H., et al. (2003).** Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol Biol Cell* 14(6): 2226-2236.
- Boute, N., Pernet, K. und Issad, T. (2001).** Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* 60(4): 640-645.
- Bouvier, M., Heveker, N., Jockers, R., Marullo, S. und Milligan, G. (2007).** BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nat Methods* 4(1): 3-4; author reply 4.

LITERATURVERZEICHNIS

- Braverman, N.E., D'Agostino, M.D. und Maclean, G.E. (2013).** Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives. *Dev Disabil Res Rev* 17(3): 187-196.
- Brown, L.A. und Baker, A. (2003).** Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med* 7(4): 388-400.
- Camoës, F., Bonekamp, N.A., Delille, H.K. und Schrader, M. (2009).** Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *J Inherit Metab Dis* 32(2): 163-180.
- Chang, H.Y., Lawless, C., Addinall, S.G., Oexle, S., Taschuk, M., Wipat, A., et al. (2011).** Genome-wide analysis to identify pathways affecting telomere-initiated senescence in budding yeast. *G3 (Bethesda)* 1(3): 197-208.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., et al. (2007).** High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318(5854): 1258-1265.
- Contreras, M., Sengupta, T.K., Sheikh, F., Aubourg, P. und Singh, I. (1996).** Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* 334(2): 369-379.
- Cooper, T.G. und Beevers, H. (1969).** Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J Biol Chem* 244(13): 3514-3520.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., et al. (2010).** The genetic landscape of a cell. *Science* 327(5964): 425-431.
- Couturier, C., Ayoub, M.A. und Jockers, R. (2002).** BRET ermöglicht die Messung von Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. *Biospektrum* 2002(5): 612-614.
- Dacres, H., Wang, J., Dumancic, M.M. und Trowell, S.C. (2010).** Experimental determination of the Forster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs. *Anal Chem* 82(1): 432-435.
- Day, R.N. (2013).** Measuring protein interactions using Forster resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods*.
- De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966).** Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46(2): 323-357.
- Diestelkotter, P. und Just, W.W. (1993).** In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2): 1717-1725.
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A.S., Odendall, C., Shum, B., et al. (2010).** Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141(4): 668-681.
- Ebberink, M.S., Mooijer, P.A., Gootjes, J., Koster, J., Wanders, R.J. und Waterham, H.R. (2011).** Genetic classification and mutational spectrum of more than 600 patients with a Zellweger syndrome spectrum disorder. *Hum Mutat* 32(1): 59-69.
- Eckert, J.H. und Johnsson, N. (2003).** Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome. *J Cell Sci* 116(Pt 17): 3623-3634.
- Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B.M., Wanders, R.J., Aubourg, P., et al. (2012).** X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 7: 51.
- Fang, Y., Morrell, J.C., Jones, J.M. und Gould, S.J. (2004).** PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164(6): 863-875.
- Fields, S. und Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230): 245-246.
- Förster, T. (1946).** Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften* 33(6): 166-175.
- Furuki, S., Tamura, S., Matsumoto, N., Miyata, N., Moser, A., Moser, H.W., et al. (2006).** Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group 8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with the Pex1p x Pex6p complex. *J Biol Chem* 281(3): 1317-1323.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ge, H., Liu, Z., Church, G.M. und Vidal, M. (2001).** Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 29(4): 482-486.
- Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., et al. (2003).** Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 14(7): 2900-2907.
- Girzalsky, W., Saffian, D. und Erdmann, R. (2010).** Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 724-731.
- Gloeckner, C.J., Mayerhofer, P.U., Landgraf, P., Muntau, A.C., Holzinger, A., Gerber, J.-K., et al. (2000).** Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochemical and biophysical research communications* 271(1): 144-150.
- Goh, K.I., Cusick, M.E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M. und Barabasi, A.L. (2007).** The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21): 8685-8690.
- Gotte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W.H., et al. (1998).** Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18(1): 616-628.
- Gould, S.G., Keller, G.A. und Subramani, S. (1987).** Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* 105(6 Pt 2): 2923-2931.
- Gould, S.J., Raymond, G.V. und Valle, D. (2006).** Peroxisomes: The Peroxisome Biogenesis Disorders. IN: *Scriber's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. D. Valle, A. L. Beaudet, B. Vogelstein und K. W. Kinzler. <http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.158>.
- Gresch, O., Engel, F.B., Nesic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., et al. (2004).** New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33(2): 151-163.
- Grimm, T., Teglund, S., Tackels, D., Sangiorgi, E., Gurrieri, F., Schwartz, C., et al. (2001).** Genomic organization and embryonic expression of Suppressor of Fused, a candidate gene for the split-hand/split-foot malformation type 3. *FEBS Lett* 505(1): 13-17.
- Guruharsha, K.G., Obar, R.A., Mintseris, J., Aishwarya, K., Krishnan, R.T., Vijayraghavan, K., et al. (2012).** Drosophila protein interaction map (DPiM): a paradigm for metazoan protein complex interactions. *Fly (Austin)* 6(4): 246-253.
- Halbach, A., Landgraf, C., Lorenzen, S., Rosenkranz, K., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R., et al. (2006).** Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J Cell Sci* 119(Pt 12): 2508-2517.
- Halbach, A., Rucktaschel, R., Rottensteiner, H. und Erdmann, R. (2009).** The N-domain of Pex22p can functionally replace the Pex3p N-domain in targeting and peroxisome formation. *J Biol Chem* 284(6): 3906-3916.
- Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Breton, B. und Bouvier, M. (2006).** Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci Chapter 5: Unit 5* 23.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R. und Bosserhoff, A.K. (2002).** Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng* 8(2): 235-245.
- Hashimoto, K. und Panchenko, A.R. (2010).** Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(47): 20352-20357.
- Hettema, E.H. und Motley, A.M. (2009).** How peroxisomes multiply. *J Cell Sci* 122(Pt 14): 2331-2336.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., et al. (2002).** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415(6868): 180-183.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P. und Tabak, H.F. (2005).** Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122(1): 85-95.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. und Kerppola, T.K. (2002).** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9(4): 789-798.

LITERATURVERZEICHNIS

- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., et al. (1988).** Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 5879-5883.
- Ideker, T. und Sharan, R. (2008).** Protein networks in disease. *Genome Res* 18(4): 644-652.
- Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H.D. und Schrader, M. (2012).** The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol* 137(5): 547-574.
- Ispolatov, I., Yuryev, A., Mazo, I. und Maslov, S. (2005).** Binding properties and evolution of homodimers in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 33(11): 3629-3635.
- Jablonski, A. (1935).** Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik* 94(1-2): 38-46.
- James, J.R., Oliveira, M.I., Carmo, A.M., Iaboni, A. und Davis, S.J. (2006).** A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods* 3(12): 1001-1006.
- Jones, J.M., Morrell, J.C. und Gould, S.J. (2004).** PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164(1): 57-67.
- Jonsson, P.F. und Bates, P.A. (2006).** Global topological features of cancer proteins in the human interactome. *Bioinformatics* 22(18): 2291-2297.
- Joshi, S., Agrawal, G. und Subramani, S. (2012).** Phosphorylation-dependent Pex11p and Fis1p interaction regulates peroxisome division. *Mol Biol Cell* 23(7): 1307-1315.
- Kaluarachchi Duffy, S., Friesen, H., Baryshnikova, A., Lambert, J.P., Chong, Y.T., Figeys, D., et al. (2012).** Exploring the yeast acetylome using functional genomics. *Cell* 149(4): 936-948.
- Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. und Roscher, A.A. (1998).** Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS letters* 429(1): 53-60.
- Kolawa, N.J., Sweredoski, M.J., Graham, R.L., Oania, R., Hess, S. und Deshaies, R.J. (2013).** Perturbations to the Ubiquitin Conjugate Proteome in Yeast Δ ubx Mutants Identify Ubx2 as a Regulator of Membrane Lipid Composition. *Mol Cell Proteomics*.
- Kunau, W.H. (1998).** Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Current opinion in microbiology* 1(2): 232-237.
- Kunau, W.H. und Erdmann, R. (1998).** Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr Biol* 8(9): R299-302.
- Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J. und Hartig, A. (1998).** The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* 273(50): 33635-33643.
- Landgraf, P., Mayerhofer, P.U., Polanetz, R., Roscher, A.A. und Holzinger, A. (2003).** Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif. *Eur J Cell Biol* 82(8): 401-410.
- Landy, A. (1989).** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949.
- Lanyon-Hogg, T., Warriner, S.L. und Baker, A. (2010).** Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes. *Biol Cell* 102(4): 245-263.
- Lazarow, P.B. und De Duve, C. (1976).** A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(6): 2043-2046.
- Lazarow, P.B. und Fujiki, Y. (1985).** Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1: 489-530.
- Lee, Y.N. und Lee, C. (2013).** Complete genome sequence of a novel porcine parainfluenza virus 5 isolate in Korea. *Arch Virol*.

LITERATURVERZEICHNIS

- Legakis, J.E. und Terlecky, S.R. (2001).** PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. *Traffic* 2(4): 252-260.
- Leon Ortiz, A.M., Reid, R.J., Dittmar, J.C., Rothstein, R. und Nicolas, A. (2011).** Srs2 overexpression reveals a helicase-independent role at replication forks that requires diverse cell functions. *DNA Repair (Amst)* 10(5): 506-517.
- Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K., et al. (2008).** DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456(7218): 66-72.
- Li, Y. (2011).** The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol Lett* 33(8): 1487-1499.
- Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T. und Jedd, G. (2011).** Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Dev Cell* 21(3): 457-468.
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. und Aubourg, P. (1999).** Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* 274(46): 32738-32743.
- Magger, O., Waldman, Y.Y., Rupp, E. und Sharan, R. (2012).** Enhancing the prioritization of disease-causing genes through tissue specific protein interaction networks. *PLoS Comput Biol* 8(9): e1002690.
- Maier, E.M., Kammerer, S., Muntau, A.C., Wichers, M., Braun, A. und Roscher, A.A. (2002).** Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol* 52(5): 683-688.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Thompson, M.J., Yeates, T.O. und Eisenberg, D. (1999).** A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. *Nature* 402(6757): 83-86.
- Marshall, P.A., Dyer, J.M., Quick, M.E. und Goodman, J.M. (1996).** Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J Cell Biol* 135(1): 123-137.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. und Kunau, W.H. (1994).** PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *EMBO J* 13(20): 4908-4918.
- Matsumoto, N., Tamura, S. und Fujiki, Y. (2003a).** The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* 5(5): 454-460.
- Matsumoto, N., Tamura, S., Furuki, S., Miyata, N., Moser, A., Shimozawa, N., et al. (2003b).** Mutations in novel peroxin gene PEX26 that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 73(2): 233-246.
- McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J., et al. (2001).** Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* 276(17): 14092-14099.
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Kruger, V., Beck, S., Wagner, R., et al. (2010).** The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* 12(3): 273-277.
- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. und Bouvier, M. (2002).** Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277(47): 44925-44931.
- Miller, J.P., Lo, R.S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W.S., et al. (2005).** Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12123-12128.
- Mo, W. und Zhang, J.T. (2009).** Oligomerization of human ATP-binding cassette transporters and its potential significance in human disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5(9): 1049-1063.

LITERATURVERZEICHNIS

- Moehle, E.A., Ryan, C.J., Krogan, N.J., Kress, T.L. und Guthrie, C. (2012).** The yeast SR-like protein Npl3 links chromatin modification to mRNA processing. *PLoS Genet* 8(11): e1003101.
- Moser, H.W. (1999).** Genotype-phenotype correlations in disorders of peroxisome biogenesis. *Mol Genet Metab* 68(2): 316-327.
- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., et al. (1993).** Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361(6414): 726-730.
- Muntau, A.C., Mayerhofer, P.U., Paton, B.C., Kammerer, S. und Roscher, A.A. (2000).** Defective Peroxisome Membrane Synthesis Due To Mutations in Human *PEX3* Causes Zellweger Syndrome, Complementation Group G. *The American Journal of Human Genetics* 67(4): 967-975.
- Muntau, A.C., Roscher, A.A., Kunau, W.-H. und Dodt, G. (2004).** Interaction of PEX3 and PEX19 visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Peroxisomal Disorders and Regulation of Genes, Springer*: 221-224.
- Muntau, A.C., Roscher, A.A., Kunau, W.H. und Dodt, G. (2003).** The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur J Cell Biol* 82(7): 333-342.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. und Miyawaki, A. (2002).** A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20(1): 87-90.
- Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., et al. (2010).** Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42(1): 30-35.
- Noguchi, T. und Takada, Y. (1978).** Peroxisomal localization of serine:pyruvate aminotransferase in human liver. *J Biol Chem* 253(21): 7598-7600.
- Novikoff, A.B. und Shin, W.-Y. (1964).** The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc* 3: 186-206.
- Nuttall, J.M., Motley, A. und Hettema, E.H. (2011).** Peroxisome biogenesis: recent advances. *Curr Opin Cell Biol* 23(4): 421-426.
- Okamoto, K. und Shaw, J.M. (2005).** Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39: 503-536.
- Opalinski, L., Kiel, J.A., Williams, C., Veenhuis, M. und van der Klei, I.J. (2011).** Membrane curvature during peroxisome fission requires Pex11. *EMBO J* 30(1): 5-16.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., et al. (2000).** The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J Biol Chem* 275(28): 21703-21714.
- Pan, X., Ye, P., Yuan, D.S., Wang, X., Bader, J.S. und Boeke, J.D. (2006).** A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 124(5): 1069-1081.
- Pesch, R. und Zimmer, R. (2013).** Complementing the Eukaryotic Protein Interactome. *PLoS One* 8(6): e66635.
- Pfleger, K.D. und Eidne, K.A. (2006).** Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 3(3): 165-174.
- Phizicky, E.M. und Fields, S. (1995).** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59(1): 94-123.
- Platta, H.W., El Magraoui, F., Baumer, B.E., Schlee, D., Girzalsky, W. und Erdmann, R. (2009).** Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Mol Cell Biol* 29(20): 5505-5516.
- Platta, H.W. und Erdmann, R. (2007).** Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol* 17(10): 474-484.
- Platta, H.W., Girzalsky, W. und Erdmann, R. (2004).** Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* 384(Pt 1): 37-45.

LITERATURVERZEICHNIS

- Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. und Erdmann, R. (2005).** Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* 7(8): 817-822.
- Praefcke, G.J. und McMahon, H.T. (2004).** The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 133-147.
- Promponas, V.J., Ouzounis, C.A. und Iliopoulos, I. (2012).** Experimental evidence validating the computational inference of functional associations from gene fusion events: a critical survey. *Brief Bioinform.*
- Purdue, P.E., Yang, X. und Lazarow, P.B. (1998).** Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* 143(7): 1859-1869.
- Rhodin, J. (1954).** Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Doctoral thesis, Karolinska Institutet.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Seraphin, B. (1999).** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17(10): 1030-1032.
- Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., et al. (2004).** Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell* 15(7): 3406-3417.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., et al. (2005).** Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437(7062): 1173-1178.
- Rucktaschel, R., Halbach, A., Girzalsky, W., Rottensteiner, H. und Erdmann, R. (2010).** De novo synthesis of peroxisomes upon mitochondrial targeting of Pex3p. *Eur J Cell Biol* 89(12): 947-954.
- Sacksteder, K.A., Jones, J.M., South, S.T., Li, X., Liu, Y. und Gould, S.J. (2000).** PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* 148(5): 931-944.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Sato, Y., Shibata, H., Nakatsu, T., Nakano, H., Kashiwayama, Y., Imanaka, T., et al. (2010).** Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J* 29(24): 4083-4093.
- Schliebs, W. und Kunau, W.H. (2004).** Peroxisome membrane biogenesis: the stage is set. *Curr Biol* 14(10): R397-399.
- Schluter, A., Real-Chicharro, A., Gabaldon, T., Sanchez-Jimenez, F. und Pujol, A. (2010).** PeroxisomeDB 2.0: an integrative view of the global peroxisomal metabolome. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D800-805.
- Schmidt, F., Dietrich, D., Eylenestein, R., Groemping, Y., Stehle, T. und Dodt, G. (2012).** The role of conserved PEX3 regions in PEX19-binding and peroxisome biogenesis. *Traffic* 13(9): 1244-1260.
- Schrader, M., King, S.J., Stroh, T.A. und Schroer, T.A. (2000).** Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 20): 3663-3671.
- Schrader, M., Reuber, B.E., Morrell, J.C., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Stroh, T.A., et al. (1998).** Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* 273(45): 29607-29614.
- Schrader, M. und Yoon, Y. (2007).** Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays* 29(11): 1105-1114.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H.D., et al. (2008).** The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134(4): 634-645.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sevin, C., Ferdinandusse, S., Waterham, H.R., Wanders, R.J. und Aubourg, P. (2011).** Autosomal recessive cerebellar ataxia caused by mutations in the PEX2 gene. *Orphanet J Rare Dis* 6: 8.
- Sewell, W.A., Brown, M.H., Dunne, J., Owen, M.J. und Crumpton, M.J. (1986).** Molecular cloning of the human T-lymphocyte surface CD2 (T11) antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8718-8722.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239.
- Shishioh, N., Hong, Y., Ohishi, K., Ashida, H., Maeda, Y. und Kinoshita, T. (2005).** GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* 280(10): 9728-9734.
- Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Koller, A., Luers, G.H., Rangell, L., et al. (1999).** Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* 10(6): 1745-1761.
- Soukupova, M., Sprenger, C., Gorgas, K., Kunau, W.H. und Dodt, G. (1999).** Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur J Cell Biol* 78(6): 357-374.
- Steinberg, S.J., Dodt, G., Raymond, G.V., Braverman, N.E., Moser, A.B. und Moser, H.W. (2006).** Peroxisome biogenesis disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1763(12): 1733-1748.
- Steinberg, S.J., Snowden, A., Braverman, N.E., Chen, L., Watkins, P.A., Clayton, P.T., et al. (2009).** A PEX10 defect in a patient with no detectable defect in peroxisome assembly or metabolism in cultured fibroblasts. *J Inherit Metab Dis* 32(1): 109-119.
- Stryer, L. und Haugland, R.P. (1967).** Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(2): 719-726.
- Stuart, L.M., Boulais, J., Charriere, G.M., Hennessy, E.J., Brunet, S., Jutras, I., et al. (2007).** A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature* 445(7123): 95-101.
- Stumpf, M.P., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., et al. (2008).** Estimating the size of the human interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(19): 6959-6964.
- Subramani, S. (1993).** Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9: 445-478.
- Sun, Y., Hays, N.M., Periasamy, A., Davidson, M.W. und Day, R.N. (2012).** Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods Enzymol* 504: 371-391.
- Suzuki, Y., Shimozawa, N., Imamura, A., Fukuda, S., Zhang, Z., Orii, T., et al. (2001).** Clinical, biochemical and genetic aspects and neuronal migration in peroxisome biogenesis disorders. *J Inherit Metab Dis* 24(2): 151-165.
- Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A. und Subramani, S. (1991).** A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10(11): 3255-3262.
- Tabak, H.F., Braakman, I. und Zand, A. (2013).** Peroxisome formation and maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 82: 723-744.
- Taylor, M.D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C.C., Mainprize, T.G., Zhang, X., et al. (2002).** Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 31(3): 306-310.
- Titorenko, V.I. und Rachubinski, R.A. (1998).** The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* 23(7): 231-233.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., et al. (2004).** Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303(5659): 808-813.
- Toro, A., Arredondo, C., Cordova, G., Araya, C., Palacios, J.L., Venegas, A., et al. (2007).** Evaluation of the role of the endoplasmic reticulum-Golgi transit in the biogenesis of peroxisomal membrane proteins in wild type and peroxisome biogenesis mutant CHO cells. *Biol Res* 40(2): 231-249.

LITERATURVERZEICHNIS

- Uetz, P., Dong, Y.A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., et al. (2006).** Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* 311(5758): 239-242.
- van der Klei, I.J. und Veenhuis, M. (2006).** PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim Biophys Acta* 1763(12): 1794-1800.
- van der Zand, A., Braakman, I. und Tabak, H.F. (2010).** Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 21(12): 2057-2065.
- Van Veldhoven, P.P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H.J. und Mannaerts, G.P. (1992).** Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 267(28): 20065-20074.
- Venetta, B.D. (1959).** Microscope Phase Fluorometer for Determining the Fluorescence Lifetimes of Fluorochromes. *Rev. Sci. Instrum.* 30: 450-457.
- von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S.G., Fields, S., et al. (2002).** Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* 417(6887): 399-403.
- Wanders, R.J.A., Visser, W.F., van Roermund, C.W.T., Kemp, S. und Waterham, H.R. (2007).** The peroxisomal ABC transporter family. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 453(5): 719-734.
- Wanders, R.J.A. und Waterham, H.R. (2005).** Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clinical genetics* 67(2): 107-133.
- Wanders, R.J.A. und Waterham, H.R. (2006).** Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75: 295-332.
- Wang, J., Wang, W., Li, R., Li, Y., Tian, G., Goodman, L., et al. (2008).** The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature* 456(7218): 60-65.
- Wang, J.H., Smolyar, A., Tan, K., Liu, J.H., Kim, M., Sun, Z.Y., et al. (1999).** Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97(6): 791-803.
- Weller, S., Cajigas, I., Morrell, J., Obie, C., Steel, G., Gould, S.J., et al. (2005).** Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis. *Am J Hum Genet* 76(6): 987-1007.
- Worthey, E.A., Mayer, A.N., Syverson, G.D., Helbling, D., Bonacci, B.B., Decker, B., et al. (2011).** Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 13(3): 255-262.
- Xu, Y., Piston, D.W. und Johnson, C.H. (1999).** A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 151-156.
- Yagita, Y., Hiromasa, T. und Fujiki, Y. (2013).** Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. *J Cell Biol* 200(5): 651-666.

DANKSAGUNG

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank...

Frau Prof. Dr. med. Ania C. Muntau, in deren Arbeitsgruppe ich tätig sein durfte und die mich über diese Arbeit hinaus fachlich gefördert sowie persönlich geprägt hat.

Herrn Dr. med. Søren W. Gersting, der dem Projekt in spannenden Diskussionen unermüdlich neue Impulse gab und mich sehr zu motivieren verstand.

Herrn Dr. rer. nat. Peter U. Mayerhofer, der mir die Grundlagen molekularbiologischen Arbeitens beigebracht hat.

den Doktoranden, Postdoktoranden und technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, mit denen ich neben der vertrauensvollen Zusammenarbeit v.a. ein freundschaftliches Verhältnis gepflegt habe.

allen Freundinnen und Freunden die mir über die Jahre am Dr. von Haunerschen Kinderspital und seinem Forschungszentrum begegnet und ans Herz gewachsen sind.

meinen Eltern und den übrigen Mitgliedern meiner Familie, deren vorbehaltloser Unterstützung und Zuneigung ich mir stets sicher sein konnte.

meiner Frau Stephanie, die ich im Labor kennen und lieben gelernt habe. Sie ist seit elf Jahren die Konstante in meinem Leben, die meine Pläne und Entscheidungen kritisch hinterfragt und uneigennützig mit mir gemeinsam trägt.

Eidesstattliche Versicherung

Schatz, Ulrich Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Aufbau eines Systems zur Untersuchung peroxisomaler Protein-Protein-Interaktionen
in der lebenden Zelle mittels Biolumineszenz Resonanzenergietransfer**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 26.11.2013

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand